Année 1966

F A C U L T E de M E D E C I N E de P A R I S

T H E S E

pour le

504

D O C T O R A T en M E D E C I N E

(Diplôme d'Etat)

par

Madame Jean-Marie SCHIMPFF, née FRANCESCHI

le 30 Mars 1938 à BASTIA

Présentée et soutenue publiquement le

3 juin 1966

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES TECHNIQUES D'ESTIMATION DE L'ACTIVITE SOMATOTROPE DU PLASMA CHEZ L'HOMME

Président : M. Pierre MOZZICONACCI, Professeur

Année 1966

F A C U L T E de M E D E C I N E de P A R I S

T H E S E

pour le

D O C T O R A T en M E D E C I N E

(Diplôme d'Etat)

par

Madame Jean-Marie SCHIMPFF, née FRANCESCHI

le 30 Mars 1938 à BASTIA

Présentée et soutenue publiquement le

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES TECHNIQUES D'ESTIMATION DE L'ACTIVITE SOMATOTROPE DU PLASMA CHEZ L'HOMME

Président : M. Pierre MOZZICONACCI, Professeur

1/1/1966

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Aubin (A.), Bénard (H.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Debré (R.), Fey (B.), Galliard (H.), Gaudart d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lelong (M.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Plédellèvre (R.), Quénu (J.), Renard (G.), Richet (C.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN . . . . . Georges BROUET.

1er ASSESSEUR . . . . . Daniel BARGETON

2e ASSESSEUR . . . . . Jean GOSSET

I. — PROFESSEURS

1° CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie et cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Bactériologie et virologie	TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
—	POLONOVSKI (J.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
—	DOGNON (A.)
—	DJOURNO (A.)
Cancérologie médicale et sociale	DENOIX (P.)
Chimie pathologique	SCHAPIRA (G.)
Embryologie	TUCHMANN (H.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	COURY (Ch.)
Histologie	GIROUD (A.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
—	KUSS (R.)
—	VERNE (J.-M.)
Pathologie exotique	N...
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	LAROCHE (Cl.)
—	BRICAIRE (H.)
—	PÉQUIGNOT (H.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	N...
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
—	LEVY (Mlle J.)
Physiologie	BARGETON (D.)
—	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

	MM.
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	CAUCHOIX (J.)
Thérapeutique	CONTE (M.)
Thérapeutique appliquée	LAMOTTE (M.)

b) Professeurs à titre personnel :

Anatomie anthropologique	OLIVIER (G.)
Anatomie pathologique	NEZELOF (Ch.)
Bactériologie	BARBIER (P.)
Biochimie médicale	DESGREZ (P.) DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.)
Histologie	COUJARD (R.)
Parasitologie	LARIVIÈRE (M.)
Pathologie expérimentale	LOEPER (J.) RICHET (G.)
Physiologie	DEJOURS (P.) ROUCAYROL (J.-Cl.) SCHERRER (J.)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L.) GOUGEROT (L.) TUBIANA (M.)
Radiologie médicale	FISCHGOLD (H.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

		MM.
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)		REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)		SOULIÉ (P.)
— — (Boucicaut)		LENÈGRE (J.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
	—	N...
	Cochin	LEGER (L.)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
	Saint-Antoine	GOSSET (J.)
	Salpêtrière	SICARD (A.)
	Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)		MERLE d'AUBIGNÉ (R.)
— — — (Foch)		PADOVANI (P.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)		FÈVRE (M.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)		DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)		MATHEY (J.)
Clinique dermatologique (Saint-Louis)		DUPERRAT (F.)
Clinique endocrinologique (Pitié)		DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)		LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)		HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)		DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)		TURPIN (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)		MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)		DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)		HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)		BERNARD (J.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)		CASTAIGNE (P.)
Cliniques médicales	Bicêtre	DEPARIS (M.)
	Broussais	MILLIEZ (P.)
	Cochin	BROUET (G.)
	Hôtel-Dieu	BARIÉTY (M.)
	Laribolsière	SÉZE (S. de)
	Pitié	DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine	KOURILSKY (R.)
	Saint-Antoine	GOUDIN (G.)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545816_0053

MM.

Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat)	DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile et pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEBRY (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales — Baudelocque	LACOMME (M.)
Cliniques obstétricales — Saint-Antoine	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	OFFRET (G.)
— — (Cochin)	BREGEAT (P.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie	MOZZICONACCI (P.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	THIEFFRY (S.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M.)
Clinique traumatologique et orthopédique (R.-Poincaré)	JUDET (R.)
Clinique urologique (Cochin)	ABOULKER (P.)
— — (Necker)	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	LAPLANE (R.)
Séméiologie médicale (A. Chantin)	DOMART (A.)
— — (Lariboisière)	BOUVRAIN (Y.)
— — (Pitié)	RAMBERT (P.)
— — (Rothschild)	WOLFROMM (R.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Broussais)	POILLEUX (F.)

b) Professeurs à titre personnel :

Hématologie	ANDRÉ (R.)
	BOUSSER (J.)
Hydrologie et climatologie	GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.)
Médecine	AZERAD (E.)
	BOUR (H.)
	CABROL (Ch.)
	GROSSIORD (A.)
	LAMBLING (A.)
	LAUNAY (Cl.)
	PAYET (M.)
	PERRAULT (M.)
	SIGUIER (F
	WORMS (R.)
Neuro-chirurgie	LE BEAU (J.)
Neurologie	LHERMITTE F.
Neuro-psychiatrie	PICHOT (P.)
Oto-Rhino-Laryngologie	MADURO (R.)
Pédiatrie	POLONOVSKI (Cl.)
	SOYER (P.)
Pneumo-Phtisiologie	KREIS (B.)
	MEYER (A.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

	MM.		MM.
Anatomie pathologique	GOUYGOU (Ch.)	Hématologie	BILSKI-PASQUIER (G.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)	Maladies infectieuses	DUPONT (V.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)	Physique médicale	COURSAGET (J.) GREMY (F.)
Biochimie médicale	CARTIER (P.) GONNARD (P.)	Physiologie	GIRARD (Fr.)
Biologie médicale	HARTMANN (L.)	Stomatologie	CHAPUT (Mme A.)
		Thérapeutique	CHASSAGNE (P.)

III. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

IV. — PROFESSEUR ASSOCIÉ

Statistique médicale et épidémiologique	SCHWARTZ (D.)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Conseillers administratifs	Mlle CHAINTREUIL (G.) M. FAYE (R.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs	Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.), LE NOIR (G.),
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.), Mlles DUROZOY (M.-F.), ROBERGE (D.), Dr SCHILLER (J.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A mon Maître

Monsieur le Professeur Pierre MOZZICONACCI

Il m'a admise dans son Laboratoire
avec beaucoup de bienveillance

Il m'a fait l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse

Qu'il veuille bien trouver ici
l'expression de ma gratitude et
de mon profond respect.

A mon Maître

Monsieur le Professeur François GIRARD

qui m'a inspiré le sujet de cette thèse et m'a guidée tout au long de ce travail.

En témoignage de mon admiration, de ma reconnaissance et de mon respectueux attachement.

A ceux et celles

qui ont participé à ce travail et en ont facilité la réalisation aux différents stades.

Avec mes remerciements amicaux.

A mes Maîtres dans les Hôpitaux

Monsieur le Docteur Raymond BERNARD (in mémorian)

Monsieur le Professeur P. MOZZICONACCI

Monsieur le Docteur M. OMBREDANNE

Monsieur le Professeur J. CATHALA

Monsieur le Docteur J. NOUAILLE

Monsieur le Professeur MANDE

pour l'enseignement qu'ils m'ont donné.

S O M M A I R E

- INTRODUCTION

- HISTORIQUE

- LES DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES :

I - LE TIBIA TEST

- Principe
- Technique
- Résultats

II - LE SULFATATION FACTOR

- Principe
- Technique
- Résultats

III - LES METHODES IMMUNOLOGIQUES

- Principe
- Rappel des différentes techniques

IV - L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

- Principe
- Technique de READ et BRYAN - Résultats
- Modifications techniques personnelles - Résultats
- Discussion

V - LES METHODES RADIO-IMMUNOLOGIQUES

a) Principe

b) Matériel utilisé

- Antigène
- Antigène marqué à l'Iode^{131}
- Sérum anticorps
- Sérum anti-anticorps

c) Etalonnage des immuns sérums

d) Séparation du complexe antigène anticorps de l'antigène resté libre

e) Protocoles pour le dosage de la somathormone

f) Résultats personnels comparés avec ceux de la littérature

Discussion

- Marquage de l'hormone de croissance
- Etude des immuns sérums
- Etude des courbes standard
  - la précision
  - la sensibilité
  - la spécificité de la technique
- Application au plasma

- CONCLUSIONS.

I N T R O D U C T I O N

La mesure de l'activité de la somatotrope hypophysaire représente une exploration indispensable dans l'évaluation des troubles de la croissance chez l'enfant, ainsi que dans l'étude de nombreux disfonctionnements endocriniens et métaboliques.

En clinique humaine, seul le dosage de l'activité somatotrope du plasma peut être envisagé mais les diverses méthodes appréciant cette activité avaient, jusqu'à ces dernières années, une sensibilité et une spécificité insuffisantes pour des mesures quantitatives.

L'introduction des méthodes radio-immunologiques a permis un progrès considérable.

Le but de ce présent travail est de donner un aperçu des méthodes de dosage les plus couramment utilisées, et de faire la description critique des méthodes pour lesquelles nous avons pu acquérir une expérience personnelle.

H I S T O R I Q U E

La première méthode proposée par EVANS et Coll. en 1942 pour la détermination quantitative de la somatotrope humaine, par son action sur la croissance pondérale du rat, n'a pu être appliquée qu'aux extraits hypophysaires (70).

En 1939, FREUD et Coll. (25) mettent en évidence que parmi les modifications tissulaires produites par l'hormone de croissance, la plus marquée est l'action sur le cartilage épiphysaire : en effet, après hypophysectomie du rat immature, les processus d'ostéogénèse et de chondrogénèse reprennent si l'animal reçoit des injections de somathormone, soit des extraits hypophysaires.

Cette action est la base du dosage biologique proposé par EVANS en 1943 (21), repris et codifié sous le nom de Tibia-Test par GREENSPAN, LI et EVANS en 1949 (31).

Après avoir étudié en 1955, les effets respectifs de l'hypophysectomie et de l'hormone de croissance humaine sur l'incorporation du soufre radioactif (^{35}S) dans le cartilage épiphysaire du rat immature, DAUGADAY et Coll. mettent en évidence l'existence d'un facteur sérique la "sulfatation-factor", ainsi appelé car il serait le médiateur de cette action particulière de la somatotrope (12-87-88).

Ce facteur sérique non exactement identifié, peut être estimé quantitativement et, est proportionnel à la quantité de somatotrope du milieu.

La mesure de l'activité "sulfatation-factor" d'un plasma humain, comme un indice de son activité somatotrope est alors proposée en 1958 (13).

Mais ce sont les progrès en immunologie qui, apprenant que les hormones protéiques humaines, antigéniques chez l'animal de Laboratoire, permettaientla fabrication d'un immuno sérum spécifique, ont permis le développement de méthodes de dosage d'une très grande sensibilité.

En 1958, HAYASHIDA et LI (43)

- mettent en évidence par la précipitation en "ring-test" la production d'anticorps anti-somathormone chez des lapins ayant reçu des injections de somathormone humaine

- démontrent que le sérum de lapin ainsi immunisé, est capable de neutraliser l'activité de croissance de l'hormone sur le "tibia-test".

La même année READ et STONE (77), rapportent que l'antisérum obtenu chez des lapins est capable d'agglutiner de façon spécifique, des globules rouges de mouton, recouverts de somathormone humaine, après avoir été tannés selon la technique de BOYDEN.

Le premier dosage immunologique est alors proposé par READ et BRYAN (78). Basé sur le principe de l'inhibition de l'hémagluttination, il s'est heurté très vite au problème d'une inhibition non spécifique par certains composants du sérum humain.

Une fois ce facteur sérique éloigné (soit par adsorptions successives ou de façon plus certaine, par extraction de la somathormone contenue dans le plasma à doser), la sensibilité de la méthode s'est révélée insuffisante pour détecter une activité somatotrope chez les sujets normaux.

C'est en 1960, avec les travaux de YALOW et BERSON (102) sur l'insuline, que le dosage radio-immunologique fait son apparition.

Il est basé sur :

- la possibilité d'utiliser l'Iode radioactif pour marquer l'antigène in vitro, sans en changer les propriétés immunologiques vis-à-vis de l'anticorps.

- l'utilisation de l'antigène iodé à dose "traceuse" facilement décelable et se comportant de façon compétitive avec l'antigène non iodé dans la formation du complexe antigène anticorps.

Les différentes techniques utilisées pour la séparation de l'antigène fixé sur les globulines immunes de celui qui n'a pas réagi,

- et la technique d'iodation proposée par HUNTER et GREENWOOD, qui permet d'obtenir rapidement et de façon relativement simple une hormone marquée à très haute activité spécifique (48).

donnet à ce dosage une spécificité suffisante et une très haute sensibilité qui vont permettre son application à toutes les hormones protéiques.

I - LE TIBIA-TEST

L'action des extraits hypophysaires sur la croissance du cartilage épiphysaire est connue depuis 1939 (25).

Les premiers travaux de EVANS ont mis en évidence que l'augmentation de la largeur du cartilage épiphysaire du rat hypophysectomisé est proportionnel à la quantité de somathormone injectée et lui ont permis de proposer une technique plus sensible d'estimation quantitative de la somathormone, que l'action sur la croissance pondérale du rat (1943 - 21). Ce procédé a été standardisé et a pu être appliqué au dosage de l'hormone purifiée sous le nom de "Tibia Test" par GREENPAN, LI et EVANS (31).

Nous donnerons quelques détails sur la technique.

Des rats femelles impubères sont hypophysectomisés à l'âge de 26 jours. Après un intervalle post-opératoire de 12 jours, la préparation à doser est injectée quotidiennement pendant 4 jours en intra péritonéale. (Des travaux préliminaires ont montré que dès l'instant où l'hormone est injectée pendant au moins 4 jours, toutes les voies sont utilisables).

Vingt-quatre heures après la dernière injection, l'animal est sacrifié, l'extrémité du tibia découpée dans le plan saggital, les épiphyses fixées par une solution formolée sont lavées, traitées par l'acétone, enfin immergées dans une solution de nitrate d'argent à 2 % et fixées au thiosulfate de soude.

L'épaisseur du cartilage épiphysaire non calcifié est mesurée sous microscope. La réponse du cartilage est proportionnelle au logarithme de la dose d'hormone injectée. Huit mesures doivent être faites et trente microns sont la limite inférieure des accroissements valables. La courbe d'accroissement est surtout utilisable entre 190 et 314 microns (ce qui correspond à des doses d'hormone pure comprises entre 5 et 120 μg. La dose minimale effective d'une préparation de somatotrope est définie comme la quantité donnée qui entraîne un accroissement significatif de l'épaisseur du cartilage. Elle est fixée à 5 μg d'hormone pure (12 μg avec la technique initiale d'EVANS en 1943).

Pour chaque dosage il convient d'utiliser 8 à 10 animaux.

La sensibilité de la méthode est de 2,5 μg/ml.

La spécificité de la méthode, vis-à-vis des autres hormones, avait déjà été étudiée par MARX et Coll. en 1944 (2-71) si l'injection quotidienne de 5 μg de thyroxine administrée produit une augmentation moyenne de l'épaisseur du cartilage de 31 μ , il n'est pas possible d'obtenir un accroissement de la réponse en augmentant les doses de thyroxine.

L'hormone thyréotrope, la prolactine, la testostérone peuvent également augmenter la largeur du cartilage du niveau de contrôle (155 μ) à 175 ou 185 μ , mais jamais plus, même en augmentant considérablement la dose des injections. Seule l'hormone de croissance pourrait stimuler l'augmentation du cartilage épiphysaire au delà de 190 microns et sans limite, la réponse étant directement proportionnelle au logarithme de la dose d'hormone.

Il faut cependant signaler que la réponse à une dose donnée de somathormone peut être augmentée par l'action combinée d'autres hormones (la Thyroxine en particulier).

L'index de précision : $\chi^2 = 0{,}0945$.

Application au plasma :

a) chez les sujets normaux :

KINSELL et Coll. (1948) en utilisant la technique initiale de EVANS, n'ont pu obtenir aucune réponse dans le plasma humain lyophillisé, chez les sujets normaux (58). GREENSPAN n'a pas obtenu plus de résultats avec du plasma entier ou fractionné (32).

SEGALOFF et Coll. rapportent, par contre, des taux de somathormone de 0 à 40 µ/ml de plasma, chez des enfants et des adultes d'âges différents, sans mentionner de corrélation avec l'âge (90).

Enfin GEMZELL ne retrouve aucune activité dans le plasma humain normal, même après fractionnement de celui-ci et injection à l'animal de la fraction la mieux appropriée (celle qui récupére la plus grande partie de l'hormone ajoutée avant extraction (26-27).

b) dans l'acromégalie et le gigantisme

KINSELL et Coll. retrouvent une activité plasmatique décelable, sans pouvoir l'évaluer quantitativement. GREENSPAN confirme ces observations.

GEMZELL et Coll. (1955) toujours après fractionnement rapportent un taux de 11,9 µg/ml chez un acromégale et 7,7 µg/ml chez un sujet atteint de gigantisme.

Cette technique n'est plus utilisée que pour le dosage biologique des préparations pharmaceutiques.

Rappelons que la première unité a été définie par EVANS, comme la quantité d'hormone que l'animal reçoit par jour pour que son poids augmente de 10 g en 10 jours.

- 1 mg d'extrait hypophysaire purifié = 25 Unités EVANS
- 1 U.I. = 1 mg (principe actif d'hypophyse antérieure desséché - 1° étalon - 1955).

II - SULFATATION FACTOR

L'estimation de l'activité, dite "sulfatation factor", d'un sérum a été proposée par Daugaday, comme un indice de la quantité d'hormone de croissance dans les milieux circulants (13).

Le "sulfatation factor" est une substance non précisément identifiée, présente dans le sérum humain et stimulant l'incorporation du soufre radioactif (^{35}S) dans le cartilage du jeune rat hypophysectomisé.

A - Le principe de la technique repose sur les faits expérimentaux suivants :

- Le soufre radioactif, lorsqu'il est injecté à des rats normaux, se fixe sur le cartilage de façon beaucoup plus active que sur les autres tissus (18).

- l'incorporation in vitro de ^{35}S dans le cartilage costal est diminuée chez les rats immatures par l'hypophysectomie, mais cette diminution peut être prévenue en administrant aux animaux hypophysectomisés de l'hormone de croissance à la dose de 25 g par jour (12-16-20)

- la fixation de soufre radioactif sur le cartilage tibial du rat décline rapidement après hypophysectomie pour atteindre 40 % du niveau normal au 14ème jour (73)

- la réponse du cartilage (fixation ^{35}S) à des petites dose de somathormone (10 à 25 μ g dose totale) est proportionelle au logarithme de la dose injectée (73).

- SALMON et DAUGADAY mettent alors en évidence que l'incubation du cartilage du jeune rat hypophysectomisé, dans le sérum de rat normal, entraîne une élévation du taux de fixation de ^{35}S, et que, par contre, celle-ci n'a pas lieu si l'incubation se fait dans un sérum de rat, lui-même hypophysectomisé (87).

Ceci amène les auteurs à penser :

1°) qu'il existe dans le plasma un facteur stimulant la prise de ^{35}S in vitro par le cartilage du rat hypophysectomisé;

2°) que ce facteur appelé "sulfatation factor" (S.F.) disparaît après hypophysectomie, sauf si celle-ci est compensée par des injections d'hormone de croissance aux doses physiologiques;

3°) que le S.F n'est pas l'hormone de croissance elle-même, puisque celle-ci, lorsqu'elle est ajoutée au milieu in vitro n'a qu'un effet très légèrement stimulant sur la fixation de ^{35}S, et encore uniquement lorsqu'elle est à forte concentration;

4°) enfin ce facteur existe dans le sérum humain normal : celui-ci permet, en effet, in vitro, la fixation de ^{35}S sur le cartilage des rats hypophysectomisés, et cette fixation est proportionnelle au logarithme de la quantité de sérum présent dans le milieu d'incubation (88).

L'activité S.F. d'un sérum humain normal peut donc être dosée in vitro par l'incubation de fragments de cartilage costal de rats hypophysectomisés, dans un milieu contenant ce sérum.

La moyenne de la fixation de ^{35}S avec des dilutions d'un sérum humain normal de référence est proportionnelle au logarithme de la quantité de sérum ajouté.

Cette relation rend possible l'estimation de l'activité S.F. d'un sérum inconnu, par comparaison avec le sérum de référence.

B - Nous rappellerons brièvement la technique proposée par DAGAUDAY et Coll. (13)

- des rats mâles SPRAGUE-DAWLEY, sont hypophysectomisés au 21° ± 2 jours, et sacrifiés 12 jours après l'intervention. Après dissection, des fragments de cartilage (10 mg) sont incubés 24 h à 37° C dans des tubes contenant 0,5 ml de tampon, 0,1 ml de sérum à étudier, 0,3 µ c de soufre et différents éléments nutritifs (dextrose, acides aminés, antibiotiques).

- Après différentes manipulations (ébullition, digestion par l'acide chlorhydrique, filtration sur papier Whatman) le précipité est remis en suspension dans de l'éthanol puis desséché sous rayonnement infra-rouge. La radioactivité est mesurée au compteur Geiger.

Un pool de sérum d'un homme jeune (24 ans) et normal est établi comme standard de référence. Ce standard doit être fait à chaque expérience car la stimulation qu'il produit sur la fixation de ^{35}S par le cartilage est très variable d'une fois sur l'autre.

Il doit être estimé à trois dilutions (0,1, 0,05 et 0,017 ml) par tube d'incubation dans le but d'augmenter la précision.

Les sérums inconnus sont étudiés dans la plupart des cas à une seule dilution.

Les résultats sont exprimés en coups/minute par mg de cartilage frais.

L'activité du sérum de référence est arbitrairement fixé à 1.

L'activité des sérums inconnus est mesurée par comparaison.

C - Résultats

1) Chez les sujets normaux

Le SF a été dosé par DAUGADAY et Coll.(14) chez différents sujets normaux, d'âges différents,avec des valeurs sensiblement égales, la plupart des résultats se situant entre 0,5 et 1,5.

	SF		SE*
11 enfants de 7 à 12 ans	0,84	±	0,12
14 adultes de 20 à 40 ans	0,78	±	0,13
5 sujets de plus de 50 ans	0,75	±	0,12
5 femmes enceintes	0,84		

2) L'activité SF s'est révélée significativement abaissée dans :

- 9 cas d'hypophysectomie chirurgicale (0,11 moyenne)
- 4 cas de nanisme hypophysaire (diagnostic clinique basé sur un retard de croissance important avec une sécrétion des différentes hormones hypophysaires, diminuée de façon évidente)
- 5 cas de syndrome de Scheehan ($<0,5$)

* Erreur type

3) Sur 9 cas d'acromégalie non traités

- 2 cas d'acromégalie inactive : l'activité SF était normale à 0,7 - 0,9.

- 7 cas d'acromégalie active. Le SF était

  - légérement élevé dans 2 cas 1,6
    1,3

  - augmenté de façon très importante dans 5 cas (3,7 à 8,2 avec une moyenne de 5,4)

L'activité SF a été étudiée par CHESLEY (9-10) toujours avec la même technique, chez les femmes diabétiques au cours de la grossesse, et chez les femmes menacées d'éclampsie, avec des taux superposables à ceux des sujets normaux.

KOGUT, KAPLAN et SCHIMIZU, ont étudié les variations du SF au cours des retards de croissance (61).

Une unité de "SF" est définie, le sérum de référence étant arbitrairement fixé à 1,0 Unités.

Les auteurs rapportent des déterminations faites sur les sérums de :

- 27 enfants normaux	0,840 ± 0,057
- 15 insuffisants hypophysaires	0,45 ± 0,024
- 26 nains sans maladie endocrine ou autre connue	0,950 ± 0,054
- 11 enfants avec un retard de croissance dont l'étiologie était reconnue comme n'étant pas hypophysaire	0,82 ± 0,057
- 1 adulte acromégale	2,2

avec dans tous les cas une bonne corrélation entre ce facteur sérique et les autre déterminations de laboratoire de la fonction hypophysaire.

D - Discussion

S'il existe sans aucun doute une relation entre l'activité de croissance d'un sérum et son activité "sulfatation factor", celui-ci ne permet cependant pas un dosage direct de somathormone.

1) Il a bien été établi en effet que le SF n'est pas l'hormone de croissance elle-même. (88-89)

Celle-ci ajouté même à très forte concentration in vitro, n'a qu'un effet très légèrement stimulant sur la fixation du ^{35}S.

Il existe un délai d'apparition du SF dans le sérum après administration d'hormone, ce délai pouvant être chez l'homme supérieur à 24 heures.

En fait tout se passe comme si la somathormone stimule in vitro uniquement la production de SF sérique, celui-ci permettant alors in vivo comme in vitro la fixation de ^{35}S sur le cartilage.

2) La nature du SF n'est pas déterminée.

Il s'agirait d'un composé protéique, ou lié à une protéine, persistant après dyalise et assez actif puisqu'il persiste également dans un sérum dilué au 1/70.

3) Son mécanisme d'action est imparfaitement connu

L'augmentation maximale de la fixation ^{35}S sur le cartilage après administration de somatotrope se produit avant que le cartilage lui-même ait atteint sa largeur maximale.

La somathormone agit donc en augmentant l'activité métabolique du cartilage mais le mécanisme de cette action reste obscur.

4) La réponse n'est pas entièrement spécifique.

- Des interférences sérieuses existent avec la thyroxine
- L'hormone thyréotrope augmente l'action de la somathormone.

/

- La cortisone et l'hydrocortisone, à larges doses, ont, au contraire, un effet inhibiteur.

5) On peut ajouter enfin que les manipulations sont longues et fastidieuses et qu'un nombre important d'animaux doit être utilisé (chaque résultat représentant la moyenne de 8 animaux).

Cette technique reste peu utilisée.

III - LES METHODES IMMUNOLOGIQUES

Elles reposent toutes sur le même principe de la réaction possible antigène-anticorps entre l'hormone de croissance humaine et l'anticorps qu'elle produit lorsqu'elle est injectée à l'animal de laboratoire.

Cette réaction peut être étudiée par différents phénomènes et en particulier :

- une réaction de précipitation du complexe antigène anticorps, ce dernier étant marqué à l'iode ^{131}

- une réaction de déviation du complément, où l'hémolyse des hématies de mouton est fonction de la concentration d'hormone dans le milieu,

mais surtout :

- l'hémagglutination qui se produit, si l'on met en présence des globules rouges recouverts d'antigène (hormone de croissance humaine) avec l'anticorps homologue,

et l'inhibition de l'hémagglutination par l'incubation préalable de l'antisérum avec l'antigène

- la compétition existant entre l'hormone antigénique et la même hormone marquée à l'Iode^{131} utilisée à dose "traceuse" dans la formation du complexe antigène-anticorps

et c'est sur ce dernier principe que se basent les méthodes actuelles, les plus sensibles et les plus spécifiques.

×

× ×

A - TECHNIQUE DE PRECIPITATION - ANTICORPS MARQUE

Nous ne ferons que citer la méthode proposée par GREENSPAN, COFFEL et Coll. : (33)

La réaction de précipitation antigène-anticorps est mise en évidence par l'utilisation d'un anticorps spécifique marqué à l'Iode^{131}. La radioactivité du précipité formée par la réaction antigène-anticorps est proportionnelle à la concentration d'hormone.

La sensibilité est de 0,5 µg.

C'est donc la moins sensible des méthodes immunologiques.

L'anti-sérum contient des anticorps non spécifiques qu'il est impossible d'éloigner complètement par des adsorptions successives.

Même s'il était possible d'abaisser la sensibilité, cette technique n'est donc pas applicable au dosage de la somathormone dans le plasma tant que l'on ne dispose pas d'une hormone très purifiée pour la préparation de l'anticorps spécifique.

B - REACTION DE DEVIATION DU COMPLEMENT

Nous rappellerons brièvement la technique proposée par BRAUMAN (8), basée sur l'étude de la consommation du complément.

- l'antigène utilisée est l'hormone de croissance humaine;

- l'anticorps est fourni par un sérum de lapin anti-hormone de croissance

- le complément non consommé dans la réaction antigéne-anticorps est apprécié quantitativement par la libération de chrome radioactif à partir d'hématies de mouton préalablement marquées avec cet isotope et sensibilisées à l'hormone de croissance

La concentration de somatotrope dans le milieu d'incubation est inversement proportionnelle à l'hémolyse des hématies.

Le test se pratique en deux temps séparés par une incubation de 24 heures, les hématies de mouton étant ajoutées en dernier.

Après centrifugation, le liquide surnageant est décanté et sa radioactivité évaluée dans un appareil à scintillations.

- Exprimée en coordonnées semi-logarithmiques, la réaction qui unit le degré de l'hémolyse à la concentration de somathormone linéaire.
- La limite inférieure de la sensibilité est de 20mμg et avec une sensibilisation particulièrement favorable, il est possible de déceler 1 mμg.
- L'erreur est de 10,1%.
- La spécificité est étudiée selon les techniques habituelles.
- L'application au plasma n'est pas mentionnée.

2) G. WELSH (100), utilise cette technique, avec une sensibilité de 2,5 mμg/ml, et en ce qui concerne la détermination de l'hormone de croissance sérique, les résultats suivants :

- Enfants (0 à 10 ans) : 0-10 mμg/ml
- Adolescents (10 à 20 ans): 10 à 20 mμg/ml
- Adultes normaux : non détectable
- Sujets hypophysectomisés : non détectable
- Acromégales : 10 à 40 mμg/ml
- Femmes enceintes : > 5000 mμg/ml

C - L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION et LE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE

Nous donnerons la description détaillée et les résultats obtenus avec ces techniques que nous avons pu personnellement étudier dans le laboratoire de Monsieur le Professeur P. MOZZICONACCI, sous la direction de Monsieur le Professeur F. GIRARD.

o

o o

IV - L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

La méthode immunologique proposée par READ et BRYAN utilise le phénomène d'hémagglutination décrit par BOYDEN.

I - PRINCIPE

A) Phénomène d'hémagglutination de BOYDEN (7)

Lorsque l'antigène ne se trouve pas en solution, mais à la surface d'une particule, son union avec l'anticorps aboutit à une agglutination de ces particules. Une hémagglutination se produit donc lorsque des globules rouges spécialement préparés à l'aide de l'acide tannique pour pouvoir fixer un antigène sur leur surface, sont incubés avec un sérum contenant l'anticorps homologue (figure 1).

La réaction se fait généralement dans un tube à hémolyse et l'hémagglutination se marque par une fine pellicule de globules rouges recouvrant le fond du tube tandis qu'en l'absence d'hémagglutination les hématies sédimentent en un bouton central ou en formant un anneau très dense (figure 2).

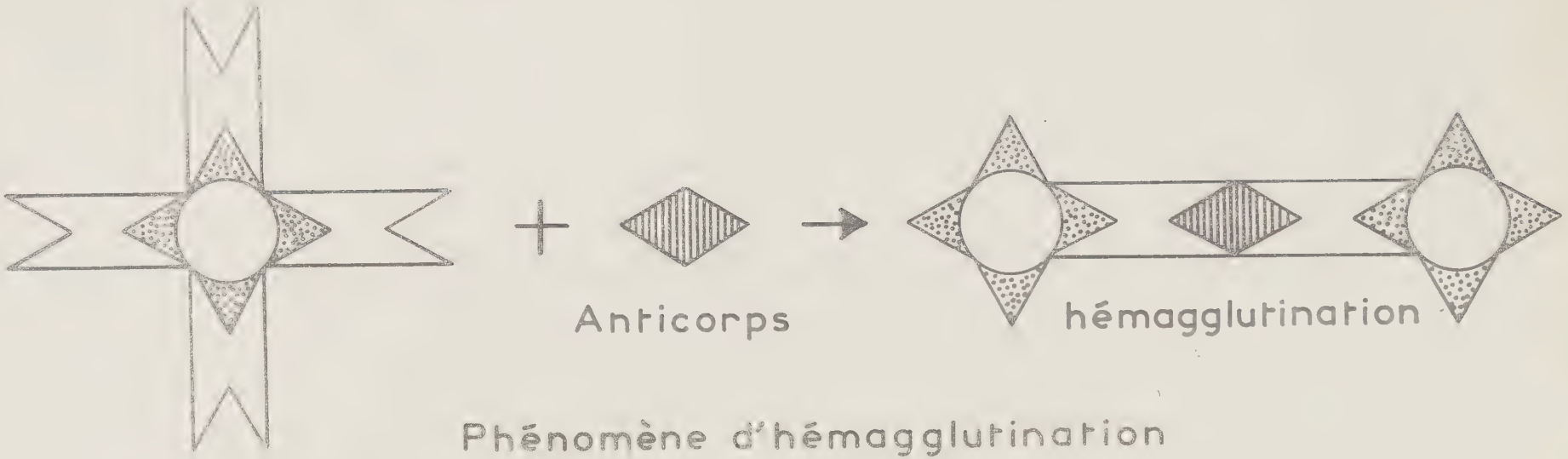
B) Cependant si tous les sites de l'anticorps ont été saturés au cours d'une incubation préalable avec l'antigène en solution, il ne se produira pas d'hémagglutination lors de l'adjonction de globules rouges porteurs d'antigène. C'est l'inhibition de l'hémagglutination décrite par BOYDEN.

Fig. 1

globule rouge
+ Ac. Tannique

Antigène

globule rouge
recouvert d'antigène

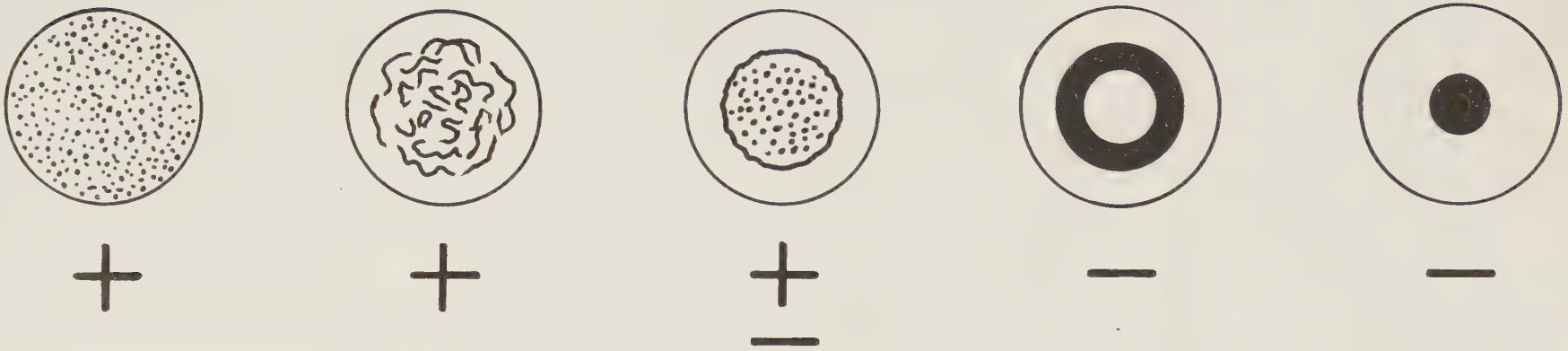


Anticorps

hémagglutination

Phénomène d'hémagglutination

Fig 2



Sédimentation des globules rouges suivant le degré d'hémagglutination

READ et STONE (77) ont les premiers utilisé ce phénomène pour le dosage immunologique de la somathormone et une première technique a été mise au point par READ et BRYAN (78).

II - TECHNIQUE

A - Technique de READ et BRYAN

a) Le matériel

- Le sérum anticorps est préparé chez des lapins adultes par des injections sous-cutanées d'un mélange volume à volume d'hormone préparée selon la technique de RABEN en solution (1 mg/ml et d'huile minérale.

Trois injections sont faites à une semaine d'intervalle, un premier titrage de l'immun-sérum est alors effectué. Si la concentration en anticorps se révèle alors insuffisante, 1 mg d'hormone dissoute dans 10 ml de sérum physiologique est injecté par voie intraveineuse. Dix jours après, un nouveau titrage est effectué. Une deuxième et dernière injection intraveineuse peut être faite six semaines plus tard.

Tous les sérums utilisés (sérum anticorps, sérum de cobaye utilisé comme diluant, sérum humain à étudier) sont décomplémentés à 56° pendant 30 minutes et adsorbés pendant 10 minutes à la température du laboratoire sur les globules de mouton devant servir au dosage.

- Préparation des globules rouges porteurs d'antigène.

Des globules rouges de mouton lavés trois fois en sérum physiologique sont mélangés à une solution d'acide tannique dilué dans du tampon phosphate Ph 7,2. Après trois lavages, les hématies sont remises en suspension en milieu tampon Ph 6,4. Cette solution est ajoutée en quantité égale à la suspension des globules rouges. Après incubation du mélange à 37°, les globules rouges sont lavés trois fois avec du sérum de cobaye au 1/80 dans du tampon phosphate et remis en suspension à 2,8 %.

b) Le dosage se fait en trois étapes :

1) Etude du pouvoir hémagglutinant du sérum; à des dilutions croissantes d'anticorps on ajoute une goutte de la suspension de globules rouges porteurs d'antigène. L'incubation du mélange se fait à la température du laboratoire pendant 3 heures. Une hémagglutination se produit dans les tubes contenant une concentration d'anticorps suffisante. Le titre de l'anti-sérum est alors défini comme la dilution la plus élevée qui donne une hémagglutination complète. Les sérums ayant un titre inférieur à 1/1.200 ne sont pas utilisés. Les titres habituellement obtenus se situent entre 1/1.200 et 1/2.500.

2) Des quantités connues croissantes de somathormone (1 à 400 mμ g/ml) sont ajoutées dans un premier temps à la dilution de l'anticorps légèrement inférieure à celle du titre préalablement déterminé. La somathormone inhibe l'activité de l'anti-sérum homologue, et les globules rouges rajoutés dans un deuxième temps ne seront agglutinés que dans les tubes contenant des quantités de somathormone trop faibles pour inactiver tous les sites de l'anticorps. La quantité la plus petite d'hormone permettant une hémagglutination complète est notée.

3) Il suffit de substituer des dilutions de plasma (1/2 à 1/92) aux quantités connues d'hormone et de noter quelle est la première dilution qui permet une complète hémagglutination. Il y aura dans cet échantillon autant de somathormone que dans la solution standard qui donne le même résultat.

Tous les tubes sont préparés en 4 exemplaires et de nombreux tubes témoins sont faits.

c) La spécificité de la technique est étudiée par les techniques immunologiques courantes.

La sensibilité est de 4 mμ g

Les taux de somathormone plasmatique sont de :

- 90 à 600 mμg/ml chez 14 enfants normaux;
- 90 à 400 mμg/ml chez 9 adultes normaux;
- 500 à 1.150 mμg/ml chez 9 acromégales;
- < que 90 mμg/ml chez 9 malades avec un hypopituitarisme (0 dans 2 cas);
- enfin chez trois de ces malades ayant eu une injection intraveineuse d'hormone préparée selon la technique de RABEN, le niveau plasmatique est retrouvé à un taux normal.

B - MODIFICATIONS APPORTEES PAR DIFFERENTS AUTEURS

HARTOG et FRAZER (40) obtiennent des titres de sérum anticorps supérieurs (1/4.000 à 1/14.000) par l'adjonction d'adjuvant complet de FREUND à la solution de somathormone utilisée pour l'immunisation des lapins. La détermination du taux de somathormone plasmatique est :

- 172 ± 42 SD mμg/ml chez les sujets normaux;
- sur 10 acromégales étudiés, 7 présentent un taux élevé;
- sur 7 insuffisants hypophysaires, 4 présentent un taux inférieur à la normale.

EHRLICH et RANDLE reprennent la même technique, avec, sensiblement les mêmes résultats (19).

FRANCHIMONT et SALMON (23) précisent quelques détails :

1) les immuns-sérums sont obtenus chez des lapins d'environ 2 Kgs par injection sous-cutanée de 1 ml d'un mélange volume à volume d'adjuvant complet de FREUND et d'une préparation d'hormone de croissance humaine (injection bi-hebdomadaire pendant un mois). Dix jours plus tard , on réalise une injection intraveineuse de 1 mg de somathormone en solution dans 10 ml de sérum physiologique. Six semaines plus tard, une nouvelle injection est faite dans les mêmes conditions; douze jours après la

dernière injection, les animaux sont saignés par ponction carotidienne après anesthésie à l'éther. L'anti-sérum est inactivé par chauffage à 56° et épuisé sur des hématies de mouton préalablement lavées.

L'étude immunologique est faite :

- par précipitation interphase ou "ring test";
- par double diffusion en milieu gélifié;
- par immunoélectrophorèse selon la technique de SCHEIDEGGER.

2) La sensibilisation des hématies se fait à 37° par incubation des globules rouges tannés en suspension à 2,5% en milieu tampon avec un même volume d'une solution de somathormone à 160 µg/ml.

3) Les solutions de somathormone utilisées comme standard s'échelonnent entre 4 et 500 mµg/ml.

4) Les sérums humains à doser sont utilisés aux dilutions suivantes :

- 1/4, 1/8, 1/10, 1/12, 1/15, 1/20, 1/25, 1/30, 1/35, 1/40, 1/50

Les taux d'hormone de croissance estimés chez 20 individus normaux sont compris entre 215 et 600 mµg/ml.

Une étude des modifications du taux de somathormone plasmatique a été faite chez 3 patients traités par implantation hypophysaire d'Ytrium radioactif. Chez 3 sujets cette intervention entraîne une diminution de la concentration de la somathormone plasmatique (200 mµg/ml). Chez un patient aucune modification n'apparaît mais on n'observait par ailleurs aucune atteinte des fonctions hypophysaires.

C - Nous avons utilisé cette technique dans le laboratoire de Monsieur le Professeur MOZZICONACCI en apportant quelques modifications dans la préparation d'hématies sensibilisées.

Matériel -

1) La préparation d'hormone de croissance humaine a été effectuée selon un procédé dérivé de celui de LI et PAPKOFF* (66).

2) Le sérum de cobaye, fourni par les laboratoires SORGA, est décomplémenté et épuisé avant d'être utilisé au 1/80 dans du tampon phosphate Ph 6,4 comme diluant.

3) Les immuns-sérums ont été obtenus chez le lapin par des injections d'hormone de croissance selon le schéma d'immunisation proposé par FRANCHIMONT et SALMON (22).

- Les sérums décantés immédiatement après coagulation sont séparés par double centrifugation, décomplémentés pendant une heure à 60°, répartis par 1 ml dans des tubes à hémolyse et conservés à - 20°

- Ils sont épuisés le matin même du dosage sur des globules rouges qui serviront de support à l'antigène. Il suffit pour cela de laisser en contact pendant 10 minutes à 4°, puis 10 minutes à 37°, un même volume de sérum et de culot globulaire préalablement lavé trois fois en eau physiologique. Les sérums sont ainsi épuisés 3 fois en changeant de culot globulaire.

- Le titrage nous a montré un titre se situant du 1/4.000 au 1/6.000 sur un lapin, et de 1/8.000 à 1/10.000 pour l'autre. Un lapin témoin ayant reçu uniquement des injections d'adjuvant de FREUND n'avait pas d'anticorps décelables par la réaction d'hémagglutination.

---

* Nous remercions le laboratoire BYLA d'avoir bien voulu nous fournir cette préparation.

4) Préparation et sensibilisation des hématies.

Nous avons successivement utilisé plusieurs techniques :

a) Ayant eu la possibilité d'étudier dans les laboratoires de Monsieur EYQUEM* (Institut Pasteur) une technique de sensibilisation d'hématies humaines, nous avons dans un premier temps tanné et sensibilisé des globules rouges ORh - provenant du centre de transfusion de l'hôpital Bicêtre.

Les hématies humaines conservées en milieu anticoagulant, utilisées du 2ème au 5ème jour, sont lavées 3 fois en eau physiologique, puis mises en suspension à 2,5% en milieu tampon phosphate Ph 7,2 et mélangées à un égal volume d'acide tannique au 1/20.000 (une solution d'acide tannique au 1/50 est faite préalablement et utilisée du 2ème au 12ème jour). Après incubation dans ce milieu pendant 10 minutes à la température du laboratoire, les hématies sont lavées trois fois en milieu tampon phosphate Ph 7,2, puis remises en suspension à 2,5% dans du liquide physiologique tamponné à Ph 6,4. Cette préparation est mélangée à un égal volume de somathormone humaine (160 µg/ml) pendant 30 minutes à la température du laboratoire, puis lavée trois fois en milieu tampon phosphate Ph 6,4 et remise en suspension à 2,5% dans du subtosan Specia à 0,35% - les hématies sont prêtes à être utilisées. En ce qui nous concerne, cette préparation n'a pu être utilisée car il s'est produit de façon systématique une hémagglutination non spécifique. Sauf dans un cas.

b) Pour éliminer le facteur variable d'hématies humaines d'origine différente , nous nous sommes proposés de formoler les hématies avant de les tanner (101). Les globules rouges formolés peuvent être conservés à 10% dans de l'eau distillée pendant 4 mois.

---

* Nous remercions Monsieur EYQUEM d'avoir bien voulu nous recevoir dans son Laboratoire.

- les globules rouges recueillis sur milieu anticoagulant sont séparés par centrifugation à 1.000 tours par minute, puis lavés 3 fois dans 10 fois leur volume de sérum physiologique et mis en suspension à 8%.

- le Ph d'une solution à 37% de formol est ajusté à 7 par de la soude N/10. Cette solution est ensuite diluée à 3% dans du sérum physiologique.

- un volume de la suspension à 8% de globules rouges est mélangé avec un volume de la solution à 3% de formol et incubé à 37° pendant 18 à 24 heures. La suspension de cellules est remuée de temps en temps pendant la durée de l'incubation. Les globules sont ensuite lavés 4 fois dans 10 fois leur volume d'eau distillée dans laquelle on peut les conserver en suspension à 4° en ajoutant du merthiolate (0,0I%) comme conservateur.

Le tannage et la sensibilisation des globules rouges formolés se font sensiblement de la même manière que pour les globules rouges frais mis à part :

- la concentration de l'acide tannique est au 1/40.000
- tous les milieux tampons phosphate sont à Ph 6;4
- la température d'incubation pour le tannage est de 56° pendant 30 minutes.

Malgré ces trois préparations différentes de globules rouges, nous n'avons pu obtenir aucun résultat valable.

c) Le tannage et la sensibilisation des globules rouges de mouton fraîchement prélevés selon la technique de FRANCHIMONT et SALMON nous ont enfin permis d'obtenir une hémagglutination spécifique et une inhibition de l'hémagglutination, mais nous avons alors été très gênés par la variation du titre du sérum anticorps dans des limites considérables nécessitant un titrage préalable de l'immun-sérum le jour même du dosage.

d) Des globules rouges de mouton formolés nous ont donné des résultats beaucoup plus reproductibles. Nous avons pu alors obtenir l'inhibition de l'hémagglutination avec 5 mμg d'hormone de croissance. Sur 10 dosages, 8 ont pu être correctement interprétés quant aux dilutions de standard mais les essais faits parallèlement sur du sérum humain entier décomplémenté et épuisé ont montré une inhibition totale de l'hémagglutination même pour des dilutions très élevées de sérum.

e) Pour essayer d'améliorer la sensibilisation des hématies, nous avons alors utilisé la technique décrite par STAVITSKY et ARQUILLA (94)

- principe : l'antigène est fixé sur les hématies par double diazotation à l'aide de la benzidine, celle-ci formant un pont chimique entre l'antigène et une protéine située à la surface de l'hématie. (figure 3). Cette liaison chimique entre l'antigène et l'hématie est beaucoup plus stable que la simple adsorption des protéines sur les hématies tannées décrite par BOYDEN.

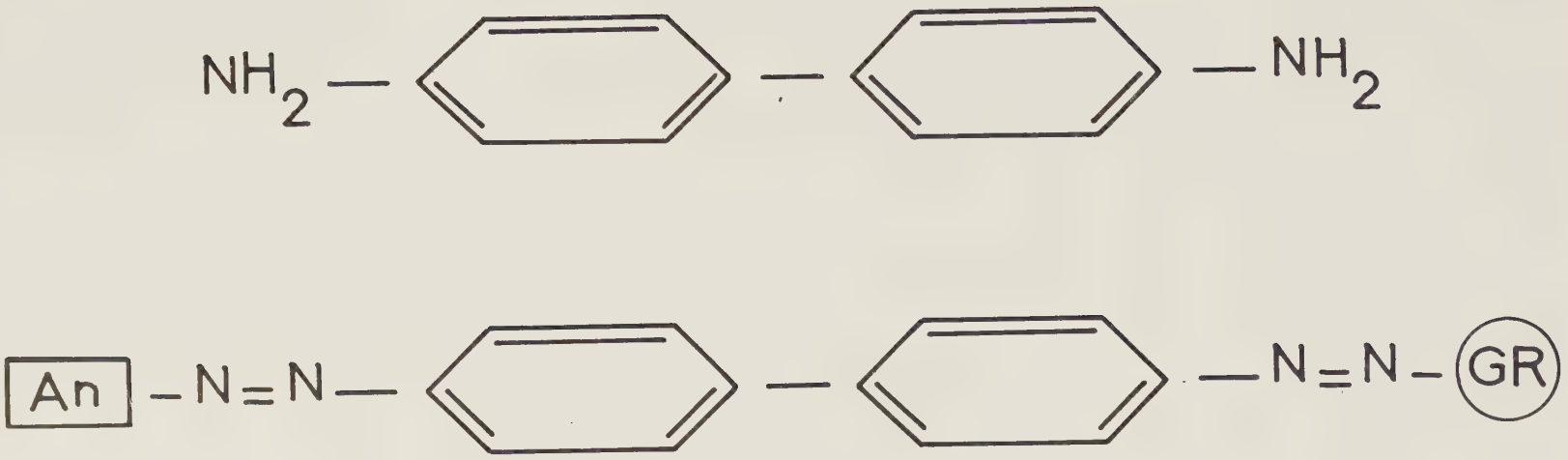
- préparation de la solution mère de benzidine (39):

Benzidine : 0,23 g H^2O : 41 ml ClH : 9 ml	Solution A
Nitrite de sodium : 0,175g H^2O : quelques gouttes	Solution B

Les deux solutions étant refroidies à 0°, la solution B est ajoutée goutte à goutte à la solution A. Le mélange est laissé 15 minutes à 0° avant d'être réparti dans des tubes à hémolyse à raison de 0,2 ml par tube. Ces tubes sont conservés à - 20° et dilués au 1/15 au moment de l'emploi.

- il est nécessaire de déterminer les concentrations optima d'antigène et de benzidine :

Fig. 3



Fixation de la S.T.H. sur le G R par l'intermédiaire de la Benzidine

à un volume constant de globules rouges lavés et dilués au 1/2, on ajoute une quantité variable d'antigène; les essais se pratiquent à des concentrations différentes de benzidine.

On choisit la concentration d'antigène parmi celles qui donnent en l'absence d'immun-sérum la sédimentation des globules rouges la plus franche (figure 4).

Les conditions de sensibilisation qui nous ont paru le plus favorable sont :
400 µg de somathormone pour 0,2 ml de la solution au 1/15 de benzidine

- sensibilisation des hématies de mouton :

les hématies de mouton fraîchement prélevées, provenant de l'Institut Pasteur, sont lavées trois fois, puis diluées au 1/2 dans du sérum physiologique. 0,15 ml de cette solution d'hématies sont mélangées en milieu tampon phosphate à 400 µg de somathormone humaine. 0,2 ml d'une solution au 1/15 de benzidine sont rajoutés en dernier en agitant doucement le tube. Ces opérations doivent être faites sur des solutions froides afin d'éviter l'altération de la benzidine. Le mélange est ensuite laissé 20 minutes à la température du laboratoire. Le culot globulaire est alors lavé deux fois avec du tampon phosphate Ph 6,4 et remis en suspension à 2,5% dans du sérum de cobaye au 1/80 dans du tampon phosphate Ph 6,4.

Cette technique est plus rapide que la sensibilisation des hématies tannées et nous a donné des résultats reproductibles et satisfaisants , avec un seuil de sensibilité de 2 mµg/ml (2 mµg/ml de la solution à doser). Nous avons pratiqué 8 séries d'expériences qui ont toutes pu être interprétées.

Pour plus de précisions et afin de faciliter la lecture les incubations sont faites le jour du dosage non dans des tubes

S.T.H. µg

Fig. 4

Benzidine : Sol. au 1/15	200	400	600	800
0,1 ml	−	−	−	−
0,2 ml	±	−	−	−
0,3 ml	+	+	−	−
0,5 ml	+	+	±	−

Détermination des quantités optima de S.T.H. et de Benzidine

à hémolyse mais dans des plaques à hémagglutination en plexiglas (80 trous) où l'on peut refaire pour chaque expérience une détermination optima du titre du sérum en resserrant les dilutions autour du titre approximatif préalablement déterminé lors de l'étude de l'immun-sérum (figures 5 - 5bis - 5ter)

La dilution finalement choisie au moment de la lecture est celle qui donne pour la plus faible quantité de somathormone le passage le plus franc de l'hémagglutination à l'inhibition de l'hémagglutination.

Des essais sur plasma (6 échantillons provenant d'adultes normaux de 25 à 40 ans) ont toujours donné des résultats très élevés (500 à 1.000 mμg/ml).

Cette inhibition non spécifique s'est retrouvée les deux fois où nous avons travaillé sur des extraits d'un même plasma.

III - DISCUSSION

A - La Technique

Si plusieurs facteurs (conditions de Ph, de température, quantité optima des différents constituants) ont leur importance et doivent être étudiés lors de la préparation des hématies tannées porteurs d'antigène, cette préparation ne semble pas avoir posé trop de problèmes aux promoteurs de la méthode.

Cependant la sensibilisation par l'intermédiaire du pont chimique de la benzidine est la seule qui ait donné entre nos mains des résultats satisfaisants et reproductibles.

L'utilisation des plaques à hémagglutination évite la détermination préalable du titre de l'immun-sérum le jour même du dosage et permet une lecture des résultats sur le titre optimum.

Dilutions de l'immun. Sérum
0,5 ml d'une solution au :

S.T.H. 0,5 ml d'une solution à n mμg/ml

	1/500	1/800	1/1000	1/1500	1/2000	1/2500	1/3000	1/3500	1/4000	1/5000
0	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±
2	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
4	+	+	+	+	±	−	−	−	−	−
10	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
15	+	+	+	±	−	−	−	−	−	−
20	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−
25	+	+	±	−	−	−	−	−	−	−
50	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Lapin n°3 22_11_64 Fig. 5

1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/32000	1/64000	1/128000	1/256000
+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
+	+	+	+	±	−	−	−	−	−
+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
+	+	+	−	−	−	−	−	−	−
+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
±	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Lapin n°4 Fig. 5 bis

De nombreux témoins doivent néanmoins être faits à chaque expérience pour éliminer au maximum le risque d'agglutination ou d'inhibition non spécifique :

- dilutions de sérum de lapin non immunisé (le sérum prélevé avant les injections de somathormone) auxquelles on rajoute des globules rouges porteurs d'antigène;
- dilutions croissantes d'immum-sérum auxquelles on rajoute des globules rouges ayant subi le même traitement que les autres mais non recouverts d'antigène

Tous les témoins doivent être négatifs.

B - Sensibilité

Le dosage étant basé sur l'apparition de l'inhibition de l'hémagglutination, la précision exige que cette inhibition apparaisse pour des dilutions d'hormone rapprochées.

De telles conditions ne sont réalisées que lorsque l'anticorps est à la dilution la plus élevée possible mais cependant encore en quantité suffisante . Il est donc nécessaire de déterminer chaque fois le titre optimum de l'anti-sérum, celui-ci variant très légèrement avec la préparation de globules rouges utilisés. (La variabilité du titre a été trouvée par tous les auteurs utilisant cette technique).

READ et BRYAN utilisent pour le dosage un titre légèrement inférieur au titre réel du sérum et ceci pour faciliter une lecture qui devient de plus en plus difficile au fur et à mesure que l'on resserre les dilutions de l'anticorps et de l'hormone standard.

Il est important d'essayer de diminuer le facteur subjectif qui intervient dans la lecture de l'hémagglutination. Des tubes sont donc toujours faits en deux ou quatre exemplaires et font l'objet de plusieurs interprétations.

Il est en général convenu de lire en hémagglutination la plus franche.

La sensibilité de la technique n'a pu être abaissée au-dessous de 2 mμg/ml.

C - Spécificité

Ce dosage nécessite en principe une préparation extrêmement purifiée de somatotrope humaine et un anti-sérum spécifique.

Les immuns-sérums que nous avons obtenus ont été étudiés par la méthode d'OUCHTERLONY* et n'ont donné qu'une seule ligne de précipitation contre l'hormone de croissance humaine utilisée pour leur préparation.

Le sérum d'un lapin témoin qui avait reçu uniquement des injections d'adjuvant de FREUND ne donnait aucune ligne de précipitation.

Par ailleurs, une préparation de somatotrope humaine (préparée par LI, 7 à 8 ans auparavant) et qui n'avait plus aucune activité biologique n'a pas donné de précipitation en Ouchterlony contre nos immuns-sérums.

Enfin il nous a été possible d'obtenir des réactions croisées entre des préparations de somatotrope humaine obtenues par des procédés et des laboratoires différents en utilisant la technique d'inhibition de l'hémagglutination, ce qui prouve que cette dernière met bien en évidence une réaction antigène-anticorps dans un système qui inclut le facteur de croissance.

Il est important de savoir si cette réaction antigène-anticorps est unique dans le système étudié et si elle ne l'est pas, de connaître dans quelle mesure les autres réactions peuvent interférer.

---

* Nous remercions Monsieur le Docteur BURTIN d'avoir bien voulu faire cette étude.

Un anticorps unique ne peut en effet exister que si l'antigène lui-même est absolument homogène. Des substances telles que l'albumine et les γ-globulines qui sont vraisemblablement présentes dans les préparations les plus purifiées de somathormone ont une activité antigénique également très élevée et cette interférence a été l'objet de beaucoup de controverses.

Si GRUMBACH et KAPLAN (36), en 1960, READ et BRYAN,(79) la même année, n'ont mis en évidence aucune hétérogénéité de l'anti-sérum obtenu par des préparations de somatotrope, préparée selon la technique de RABEN, HARTOG et FRAZER (40), en 1961, utilisant la technique d'OUCHTERLONY, mettent en évidence plusieurs lignes de précipitation de l'anti-sérum contre du sérum humain.

HIRSCHFELD et GEMZELL et WIDE en 1961 (47) ont montré en immuno-électrophorèse la présence d'anticorps à l'albumine et aux γ-globulines dans un anti-sérum obtenu par la somatotrope préparé selon la méthode de LI et PAPKOFF.

Par la méthode d'OUCHTERLONY aussi bien qu'en électrophorèse, BOUCHER (6) met en évidence un deuxième composant de l'anti-sérum.

LARON et ASSA en 1962 (62), utilisant l'immuno-électrophorèse et l'inhibition de l'hémagglutination, mettent en évidence la contamination par l'albumine des préparations de somatotrope obtenues avec la technique de LI et la technique de RABEN.

En 1962, HADDEN (38), O'CONNOR et SKINNER en 1963 (74) indiquent que seules les techniques très sensibles, telles que le test de PREER ou la réaction d'hémagglutination, montrent la présence d'anticorps contaminants, mais que ces anticorps à l'albumine et aux γ-globulines qui sont présents dans l'immun-sérum ne peuvent interférer dans la technique de l'hémagglutination.

Ceci peut s'expliquer par le fait que des substances telles que l'albumine et les globulines présentes dans la préparation d'antigène en quantités minimes sont capables d'élever le titre mesurable d'anticorps à cause de leur grand pouvoir antigénique chez le lapin. Cependant, lorsque des globules rouges sont recouverts d'antigène, le nombre de molécules d'albumine et de γ-globulines qui adhèrent à leur surface est tellement inférieur à celui de la somathormone qu'elles seraient incapables d'interférer dans les réactions de façon significative.

Le niveau moyen de la concentration de somathormone plasmatique chez 6 sujets normaux a été estimé par ces auteurs à 261 $\pm$ 23,6 (erreur type) mμg/ml.

A l'intérieur des limites de la technique, cette méthode apparaît comme un moyen sensible et sûr de comparaison entre des solutions de somathormone.

Cependant, l'estimation du taux de somatotrope plasmatique présente des difficultés. En effet, malgré la similitude des résultats publiés par les différents laboratoires qui ont utilisé la technique de READ et BRYAN, les investigations ultérieures en ont détruit la validité.

MAC GARRY(68-69), le premier, en 1962, rapporte que la technique ne peut être appliquée au dosage de la somatotrope dans le sérum humain à cause d'une inhibition non spécifique de l'hémagglutination par les protéines du sérum : trop souvent, les sérums de sujets avec hypopituitarisme indiscutable ou les sérums d'acromégales traités chirurgicalement, et dont l'autopsie vérifiait plus tard l'absence d'hypophyse, donnaient les mêmes valeurs en somatotrope que les sérums des sujets normaux.

KNOBIL (59) met en évidence que la technique de READ donne des valeurs sensiblement identiques d'hormone de croissance dans le sérum de singe normal et de singe hypophysectomisé.

Au même moment, trois autres groupes de chercheurs, READ et Coll., DOMINGUEZ et PEARSON (17), KAPLAN et GRUMBACH (56), confirment l'hypothèse de MAC GARRY.

DOMINGUEZ et PEARSON (17) proposent alors un procédé d'extraction de l'hormone de croissance la séparant ainsi des autres protéines du plasma. Mais, lorsque ce procédé d'extraction a été appliqué au sérum d'adulte normal, aucune activité hormonale n'a été mise en évidence, indiquant par là que dans le sérum humain normal le niveau de l'hormone somatotrope serait inférieur à 20 mμg/ml (limite de sensibilité de la technique initiale de READ et BRYAN par DOMINGUEZ et Coll.).

Seul, le sérum de 4 sujets acromégales pouvait être mesuré quantitativement dans l'ordre de 35 à 300 mμg/ml.

KAPLAN et GRUMBACH (56) proposent un procédé plus simple susceptible d'éloigner les inhibiteurs non spécifiques du sérum :

- l'inactivation du sérum à 60° pendant 1 heure
- et différentes adsorptions à des températures variables, (c'est ce procédé que nous avons utilisé sans résultat).

La sensibilité de leur technique est de 6 mμg/ml et ne leur permet pas l'estimation de la somatotrope plasmatique chez les sujets normaux.

- 11 sujets sur 14 se trouvent au-dessous de la limite de la sensibilité de la technique
- 5 sujets, avec une acromégalie active, avaient un taux de somatotrope plasmatique compris entre 120 et 240 mμg/ml.

o
o o

EN RESUME, la technique de READ et BRYAN, mise au point dans différents laboratoires, a une sensibilité variant de 4 à 20 mμg/ml, selon les auteurs et permet seulement l'estimation de la somatotrope plasmatique chez l'acromégale excluant le dosage chez le sujet normal une fois le sérum débarrassé des inhibiteurs non spécifiques.

Nous avons pu reproduire la technique avec une sensibilité de 2 mμg/ml, mais les essais qui ont été faits sur plasma n'ont pu être interprétés.

Nous avons préféré abandonner définitivement cette méthode lorsqu'il nous a été possible d'aborder le dosage radioimmunologique, sous la direction de Monsieur le Professeur F. GIRARD.

TABLEAU N° 1

TAUX DE S.T.H. PLASMATIQUE (m µg/ml) SELON LES DIFFERENTES TECHNIQUES

Technique	Auteurs	Sensibilité	Acromégalie	Sujet Normal	Insuf. Hypoph.
TIBIA-TEST	GREENSPAN	2,5 µg/ml		N.D.	
	GEMZELL		11,9 µg/ml (acromégale) 7,7 µg/ml (gigantisme)	N.D.	
SULFATATION FACTOR	DAUGADAY (1)	Sujet normal de référ.= 1	3,7-8,2 (3)	0,84 (11 enf.) 0,78 (14 ad.) 0,75 (5 ad. 5 ans)	0,5
			m µg/ml		
INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION	READ & BRYAN	4 m µg/ml	500 - 1150	90 - 600	0 - 90
	HARTOG & FRAZER	6-10m µg/ml	320-462 (7) Taux normal (3)	88 - 256	45-76 (4) T.N. (3)
Sur plasma ou sérum brut	BOUCHER & MASSON		120-360 (27)	100-480 (8) 100 (1)	10-90 (11) 190 (1)
	HAYASHIDA		112-448	84-124	
	FRANCHIMONT			215-600	
Sur extrait de plasma	READ&BRYAN		90	N.D.	
	DOMINGUEZ	20 m µg	35-300	N.D.	
	KAPLAN & GRUMBACH	20 m µg	120-240	60-120	
DEVIATION DU COMPLEMENT	J. BRAUMAN	20 m µg			
DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE	HUNTER & GREENWOOD	0,07m µg/ml	10-130 (4)	0,52 ± 0,46 (41)	

(1) Les résultats donnés par la technique de "S.F" sont exprimés en unités
- entre parenthèses le nombre de sujets
- N.D = Non Détectable

V - LE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE *

Le principe du dosage radio-immunologique est basé sur les modifications du complexe "antigène-anticorps" en fonction de la quantité d'antigène présente dans le milieu de réaction.

Les travaux de YALOW et BERSON (102) sur le dosage de l'insuline ont mis en évidence :

- qu'il est possible de marquer une hormone protéique par de l'Iode^{131} sans en changer les propriétés immunologiques vis-à-vis de l'anticorps homologue; ainsi en présence des deux antigènes, marqué et non marqué, l'anticorps se combine avec chacun d'eux proportionnellement à leur concentration respective. (Lois de la dilution isotopique).

- que la séparation de l'hormone marquée et fixée sur l'anticorps, de l'hormone marquée qui n'a pas réagi, permet la détection d'un anticorps à très faible concentration même en l'absence de précipitation.

---

* Nous tenons à remercier :

- Messieurs TCHOBROUTSKY, ROSSELIN, ASSAN et Coll. (Chaire de Clinique du Diabète et des maladies de la Nutrition - Professeur M. DEROT) pour leurs conseils et leurs dons d'hormone marquée.
- Monsieur le Docteur GREENWOOD pour ses conseils.

- enfin, qu'il est possible de déplacer l'hormone marquée liée à l'anticorps par l'adjonction d'hormone non marquée; en effet, la réaction antigène + anticorps ⟶ complexe "antigène-anticorps" obéit à la loi d'action de masse : si l'on choisit une dilution de l'anticorps telle que celui-ci soit à la limite de la saturation, la quantité d'antigène non lié à l'anticorps est proportionnelle à la quantité d'antigène ajouté au milieu d'incubation; en conséquence, le pourcentage d'une quantité fixe d'antigène marqué lié à l'anticorps diminue proportionnellement avec l'adjonction d'hormone non iodée ou standard dans le milieu d'incubation.

-il est alors possible d'établir des courbes avec des solutions d'antigène; les dosages plasmatiques se feront par comparaison, des dilutions différentes de plasma remplaçant les solutions de standard dans les milieux d'incubation.

Le marquage de l'hormone protéique est possible grâce à la propriété présentée par la molécule de pouvoir fixer, par oxydation, l'iode radioactif sur ses groupements tyrosine sans que cette fixation entraîne des modifications importantes des propriétés immunologiques de l'hormone.

En pratique, le dosage radio-immunologique basé sur la compétition entre l'hormone antigénique et la même hormone marquée par l'iode^{131} dans la formation du complexe "antigène-anticorps" peut être appliqué à toutes les hormones protéiques. (4-5).

Nous examinerons le matériel nécessaire et la technique finalement choisie pour la détermination de l'hormone somatotrope plasmatique, avant d'en discuter les résultats.

MATERIEL

A - L'Antigène

L'hormone de croissance humaine purifiée selon la technique de RABEN est la plus utilisée (75).

La préparation lyophilisée est conservée à 4° en ampoules de 2 mg *.

Les premières dilutions que nous utilisons également pour le marquage sont faites en tampons phosphate 0,05 M : 2 mg d'hormone sont dissous dans un ml d'eau distillée; il est parfois nécessaire d'ajouter une goutte de soude (NaOH N/10) pour clarifier la solution. On rajoute alors 9 ml de tampon phosphate, 0,05 M Ph 7,5.

La solution à 200 µg par ml ainsi obtenue est conservée plusieurs mois à -20°, répartie par 0,5 ml dans des tubes à hémolyse convenablement scellés. Les dilutions ultérieures sont toutes faites en milieu tampon véronal 0,07 M Ph 7,6 albuminé à 2 mg par ml (albumine bovine SIGMA), une solution d'albumine plus concentrée (5 mg par ml) ou des dilutions en sérum de cobaye normal au 1/100 sont également utilisées (28-95).

La dilution la plus basse conservée à -20° est à 1 µg par ml. Ces derniers tubes ne sont décongelés qu'une seule fois, l'hormone non utilisée est jetée.

---

* Nous remercions Monsieur ELSAIR pour ses dons d'hormone.

B - Préparation de l'hormone marquée

La technique proposée par HUNTER et GREENWOOD (34) est actuellement utilisée par tous les auteurs. C'est un procédé simple qui permet la préparation d'une hormone marquée à haute activité spécifique (250 à 500 µc par µg). 5 µg d'une préparation purifiée d'hormone somatotrope humaine et 2 à 4 mc d'iode^{131} sont mélangés dans un tube auquel on ajoute de la chloramine T, celle-ci agissant comme oxydant. Le métabisulfite de sodium arrête la réaction. La séparation de l'iode libre de l'iode fixé sur l'hormone est faite sur une colonne de séphadex-G 50 équilibrée avec du tampon véronal 0,07 M Ph 8,6 et saturée avec 20 mg d'albumine bovine. L'élution se fait en tampon véronal.

Nous avons repris la technique de HUNTER et GREENWOOD sans y apporter de grandes modifications. Le matériel utilisé est préparé la veille ou le matin même du marquage.

- tampon phosphate Ph 7,5 0,5 M
  0,05 M
- une solution de chloramine T à 4 mg/ml
- solution de métabisulfite de sodium à 2,4 mg/ml
- solution d'iodure de potassium à 10 mg/ml

(ces différentes solutions sont faites dans du tampon phosphate 0,05 M)

- une colonne de séphadex de 15 à 20 cm de hauteur est équilibrée avec du tampon véronal; elle sera rincée le jour même du marquage par 1 ml de tampon véronal contenant 20 mg d'albumine bovine, puis par 20 ml de tampon véronal seul.

L'iode^{131} est fourni par le Centre de SACLAY, en général à une concentration inférieure à 20 mc/ml ce qui nécessite une évaporation : 2 mc sont prélevés avec une pipette Pasteur, mis dans un tube à hémolyse et évaporés sous courant d'air jusqu'à ce que le volume soit réduit à 25 µl, très approximativement.

Le marquage se fait à la température du laboratoire en ajoutant dans le tube contenant les 2 mc d'iode :

- 25 µl de tampon phosphate 0,5 M Ph 7,5
- 25 µl d'une solution à 200 µg par ml d'hormone de croissance humaine
- 25 µl de la solution de chloramine T

On ajoute 100 µl de métabisulfite de sodium après avoir agité le tube 40 à 60 secondes.

200 µl de la solution d'iodure de potassium sont ajoutés en dernier.

Le volume total de la réaction, environ 400 µl, est prélevé avec une pipette Pasteur et déposé sur la colonne de séphadex-G 50. Le tube dans lequel s'est effectué le marquage est rincé avec 200 µl d'iodure de potassium. L'élution se fait avec du tampon véronal 0,07 M Ph 8,6 et des quantités aliquotes (1 ml) sont recueillies dans des tubes à hémolyse (18 à 22 tubes).

La radioactivité est comptée dans un détecteur à cristal à puits (SAIP).

Il apparaît ainsi deux pics de radioactivité,le premier contenant l'hormone somatotrope marquée, le deuxième l'iode non utilisé.

Le pic d'hormone marquée est rassemblé dans un tube contenant 1 ml de tampon véronal albuminé à 50 mg/ml, puis dilué à 10 m µg/ml dans du tampon véronal albuminé à 2 mg/ml.

L'hormone marquée est conservée à -20° et peut être utilisée pendant 15 à 20 jours.

C - Préparation du sérum anticorps

L'immun-sérum est obtenu en injectant une solution d'hormone de croissance humaine à des lapins ou à des cobayes, ces derniers étant plus volontiers utilisés pour des raisons pratiques. Le schéma des injections varie selon les auteurs; la voie sous-cutanée a été adoptée par tous en associant quelquefois des injections intraveineuses chez le lapin. De l'adjuvant de FREUND est toujours ajouté à la solution d'hormone dans le but de favoriser l'apparition des anticorps.

Nous avons préparé un sérum anticorps en injectant à des cobayes, par voie sous-cutanée, 1 ml d'un mélange volume à volume d'adjuvant complet de FREUND et d'hormone de croissance humaine (solution à 1 mg/ml préparée, suivant un procédé dérivé de celui de LI et PAPKOFF, par les Laboratoires BYLA).

En moyenne 3 à 5 injections espacées de 8 jours sont nécessaires pour obtenir un taux suffisant d'anticorps. De petites quantités de sang prélevées avant chaque injection par ponction intra-cardiaque permettent de suivre l'élévation du taux des anticorps plasmatiques. Les cobayes sont saignés par ponction intra-cardiaque 15 jours après la dernière injection.

Le sang, prélevé aseptiquement, est coagulé à la température du laboratoire et le sérum séparé par double centrifugation est conservé à -20°, réparti par 0,2 ml dans des tubes à hémolyse.

Etudiés en immuno-électrophorèse en gélose, ces sérums n'ont donné qu'une seule ligne de précipitation.

D - Préparation d'un sérum de lapin anti γ-globuline de cobaye

Il est obtenu en injectant des γ-globulines de cobaye à des lapins.

1°) Préparation des γ-globulines de cobaye.

Le sang, prélevé aseptiquement par ponction intra-cardiaque sur des cobayes anesthésiés à l'éther, est centrifugé dans des tubes stériles. Les sérums surnageants sont rassemblés dans un becher où l'on rajoute une solution sursaturée de sulfate d'ammonium en quantité suffisante pour obtenir approximativement une dilution finale de 33% de sulfate d'ammonium et 66% de sérum.

Le mélange laissé 12 heures environ à 4° est centrifugé pendant une heure à 4°. Le surnageant est éloigné et le précipité est dissous soit dans du sérum salé isotonique, soit en tampon véronal Ph 8,6, soit un mélange des deux en parties égales, le volume du liquide rajouté étant égal à la moitié de la quantité initiale de sérum.

La solution est mise à dialyser dans un mélange de sérum physiologique et de tampon véronal pendant 24 heures à 4°. La solution de γ-globulines est mélangée à un égal volume de subtosan retard Spécia, et répartie en flacons de 5 ml, et conservée à -20°. Une petite quantité de la solution est gardée pour faire un dosage de protéine.

2°) Vaccination des lapins

Trois injections séparées par 15 jours d'intervalle sont nécessaires. On injecte chaque fois en sous-cutané :

- 100 mg de γ-globuline
- 1 ml d'adjuvant complet de FREUND.

Le sang est prélevé dans la veine de l'oreille 14 jours après la dernière injection. Les prélèvements peuvent être répétés plusieurs fois en continuant alors l'immunisation des animaux (il est utile de mélanger aux aliments du lapin du protoxalate de fer).

3°) Préparation du sérum anti γ-globuline de cobaye

Le prélèvement est effectué dans l'artère ou dans la veine de l'oreille du lapin avec une aiguille stérile de 8/10 de mm à biseau court dirigé en haut en commençant par la partie distale. (Il est conseillé de frotter l'oreille avec un tampon imbibé de xylol, ce qui rend l'artère centrale plus visible). La rétraction du caillot se fait à la température du laboratoire.

La préparation de sérum de lapin anti γ-globulines de cobaye (SLAC) est faite, si possible, dès l'obtention du sérum. Il est possible de mélanger des sérums venus d'animaux différents. La technique est identique à celle utilisée pour les γ-globulines de cobaye, mais la solution sursaturée de sulfate d'ammonium doit être rajoutée au sérum de lapin à une dilution finale de 50%.

Le SLAC est conservé à -20°.

TECHNIQUE

I - Etude des immuns-sérums

Les courbes de titrage des immuns sérums sont établies en préparant une série de tubes à hémolyse contenant dans du tampon véronal Ph 8,6 albuminé à 2 mg/ml, q.s.p. 0,5 ml :

- des dilutions croissantes de l'immun-sérum
- une quantité constante d'hormone de croissance iodée que nous appellerons "traceur". (S.T.H.*).

Les tubes convenablement bouchés sont laissés 5 à 10 jours à 4°.

La variation du système en fonction des différentes quantités d'anticorps est appréciée :

- soit, sur le rapport de l'hormone marquée liée aux anticorps ou B (bound = lié) et de l'hormone marquée totale (ou T) mise dans le tube

- soit, sur la diminution du rapport B/F (F = free = libre) F étant la quantité d'hormone marquée qui n'a pas réagi.(Tableau 2).

La dilution d'anticorps utilisée pour le dosage est celle qui fixe entre 40 et 60% de l'hormone marquée.

II - La séparation de l'hormone marquée liée aux γ-globulines de cobaye de celle qui n'a pas réagi se fait :

- soit par précipitation de l'hormone liée aux γ-globulines par un sérum anti γ-globulines(95-99).

TABLEAU N° 2

PROTOCOLE POUR L'ETALONNAGE DE L'IMMUN-SERUM

Incubations le 17.9.65 - Electrophorèse le 23.9.65

Anticorps : Cob. 10^B - dilutions données en dilution finale dans le tube

Traceur : STH* 132 µc/µg

Solution initiale 1 mµg/ml
100 µl : 0,1 mµg par tube

Tampon véronal 0,07M, Ph. 8,6 q.s.p 500 µl

Tube	Tampon	AC 50 µl	S.T.H. 100 µl	F	B	T	d	B-d	T-d	B/T	B/F
1	350µl	1/64.000	100µl	58	249	307	37	212	270	78,5	3,66
2		1/512.000		72	216	288	35	181	253	71,5	2,52
3		1/1.024.000		80	216	296	35	181	261	69,34	2,26
44		1/2.048.000		86	174	260	31	143	229	62,4	1,67
5		1/4.096.000		105	120	225	27	93	198	46,96	0,885
6		1/8.192.000		166	90	259	31	62	228	27,2	0,373
7		1/16.384.000		191	71	262	31	40	231	17,3	0,210
8		1/32.768.000		224	37	261	31	6	230	2,6	0,027
9		1/64.000.000		208	27	235	34	0			
10	400µl	0		209	14	223	dénaturé			6,27%	

- Séparation par électrophorèse en gélose
- Les comptages sont exprimés en coups/100 secondes

F = hormone libre
B = hormone liée
T = total
d = dénaturé calculé à partir du tube témoin (tube 10)

- soit, par électrophorèse et, selon les auteurs :
  - sur acétate de cellulose (49)
  - sur papier DEAE (28)
  - sur papier Whatman 3 MM (95)
  - enfin sur gélose (96).

Nous avons utilisé de préférence la séparation en gélose. Quelques essais sur papier Whatman 3 MC ont été faits.

A - Electrophorèse en gélose

1) Préparation de la gélose

La gélose Noble Difco est dissoute à 4% dans de l'eau distillée préalablement portée à ébullition après avoir été ramenée à Ph 7 par quelques gouttes de soude N/10. Après refroidissement, les blocs de gélose sont mis à dialyser pendant 4 jours à 4° dans de l'eau distillée ramenée à Ph 7 et changée chaque jour. Ramenée alors à la concentration de 1%, dans du tampon véronal 0,035 M Ph 8,6, la gélose est conservée à 4°.

Elle est coulée sur des lames de microscope (5 à 6 ml/lame au moment de l'utilisation) - Figure 6.

2) Electrophorèse

Il est nécessaire de faire préalablement une lame témoin, afin de déterminer l'emplacement de la ligne de départ et à quelle distance de celle-ci, il conviendra de diviser la gélose.

Après deux heures d'électrophorèse, sous 70/90 volts, la gélose est divisée en deux parties, l'une contenant avec le côté cathode du gel l'hormone somatotrope liée aux γ-globulines, l'autre contenant avec le côté anode l'hormone qui n'a pas réagi.

La radiactivité des 2 parties est comptée séparément.

Electrophorèse en gélose

La ligne de départ est à 22mm du bord coté cathode
la séparation se fait à 5mm très exactement de la ligne de départ.

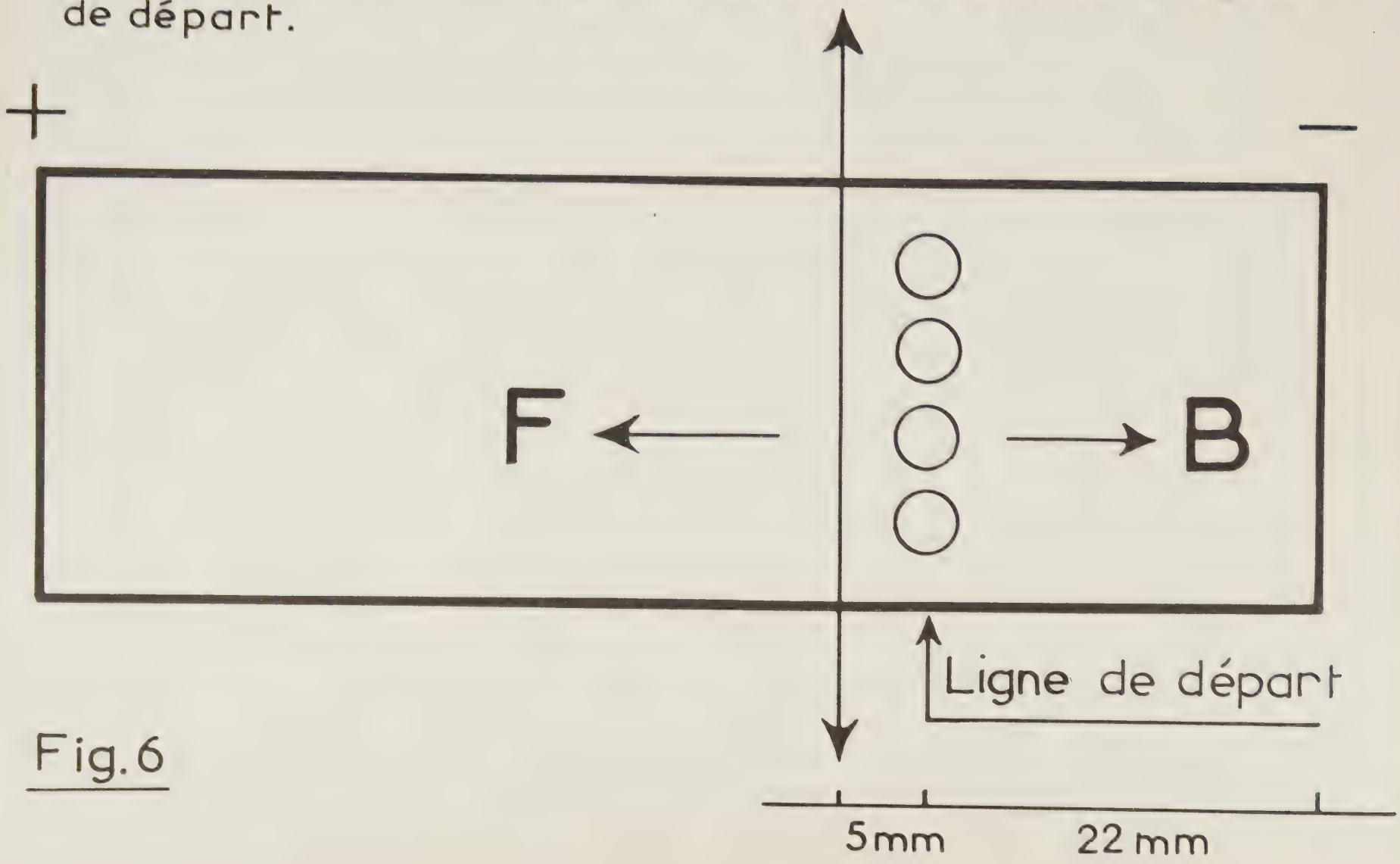


Fig.6

B - Electrophorèse sur papier

Nous avons utilisé du papier Whatman 3 MC, le produit à séparer (environ 200 µl) est déposé sur la ligne de départ du côté cathode. L'hormone libre reste sur la ligne de départ alors que l'hormone fixée aux γ-globulines se dirige avec celles-ci vers l'anode. Après deux heures d'électrophorèse la bande est découpée en deux parties, environ à 2 cm de la ligne de départ côté anode, chaque partie est roulée dans un tube à hémolyse et comptée séparément (là encore une bande a été préalablement coupée en fines bandes de 2 mm, comptées séparément afin de déterminer l'emplacement des deux pics).

Quelle que soit la technique utilisée, l'hormone marquée liée migre avec les γ-globulines. En l'absence d'immunsérum, on ne devrait donc retrouver aucune trace d'hormone marquée à l'emplacement des γ-globulines. Or, même en l'absence d'anticorps, il se produit un petit déplacement de l'hormone marquée. Ce phénomène a toujours été constaté; il s'agirait d'une partie de l'hormone marquée qui s'est dégradée, soit au cours du marquage, soit au cours de l'incubation. Cette partie est couramment appelée "dénaturé" ("damaged"). Il est nécessaire de calculer le dénaturé en faisant une lame témoin et d'effectuer une correction sur les autres lames.

C - Précipitation par un sérum de lapin anti γ-globulines de cobaye

Il est encore possible de séparer l'hormone libre de l'hormone fixée aux γ-globulines de cobaye, en précipitant ces dernières par un sérum de lapin anti γ-globulines de cobaye.

Au volume total de la réaction, (qui contient le sérum anticorps à la dilution convenable, de l'hormone marquée en quantité fixe et des solutions de standard à concentration croissantes du plasma à étudier) et après 5 jours d'incubation, on

ajoute 0,5 ml de SLAC à la dilution convenable, préalablement étudiée, et suffisante pour provoquer une précipitation. Après 24 heures d'incubation à 4°, le mélange est centrifugé une heure à 2.000 tours.

L'hormone fixée aux γ-globulines de cobaye précipite avec celles-ci sous l'influence du sérum de lapin anti γ-globuline de cobaye. Une partie aliquote du surnageant et la radioactivité totale du tube sont déterminées.

III - La courbe de standards

Elle est établie en préparant une série de tubes à hémolyse contenant :

- une quantité constante d'anticorps à la dilution convenable
- une quantité constante de " traceur " (0,05, 0,1, 0,3mμg par tube)
- des quantités croissantes d'hormone somatotrope en solutions connues ou "standards" (0,001 à 6 mμg par tube)
- le volume total de la réaction est amené à 500 μl par tube avec du tampon véronal albuminé à 2 mg par ml.

La durée de l'incubation et les moyens de séparation sont identiques à ceux utilisés pour l'étalonnage des immuns-sérums.

La variation du système, en fonction des quantités croissantes d'hormone non marquée, est appréciée sur la diminution :

- soit du rapport : hormone marquée liée ou B, sur hormone marquée totale ou T (B/T)
- soit sur la diminution du rapport B/F, F étant la quantité d'hormone qui n'a pas réagi.

Une courbe de standard doit être faite pour chaque dosage (Tableau N° 3).

TABLEAU N° 3

- PROTOCOLE DE COURBE STANDARD -

Tube	Tampon µl	A C	Standard 100 µl	Trac	F	B	T	d	B.d	T.d	B/T	B/F
1	400	0	0	100µl	1704	79	1784	4,43%				
2	300	100µl	0		1257	580	1837	69	511	1768	28,9	0,407
3	200		0,05		1430	608	2038	77	531	1961	27,1	0,371
4	200		0,1		1210	535	1745	66	469	1679	27,9	0,388
5			0,2		1233	474	1707	64	410	1643	25	0,333
6			0,3		1207	418	1625	61	357	1564	22,8	0,296
7			0,4		1277	389	1666	63	326	1603	20,3	0,255
8			0,6		1434	355	1769	67	268	1702	15,7	0,187
9			0,8		1552	324	1876	71	253	1805	14,0	0,163
10			1,2		1888	285	2173	82	203	2091	9,7	0,107
11			1,6		1730	231	1961	74	157	1887	8,3	0,091
12			2,4		2292	258	2550	96	162	2454	6,6	0,071
13			3,2		1667	144	1811	68	76	1743	4,4	0,046
14	↓	↓	4,8 mµg/tub.	↓	2237	141	2378	90	51	2288	2,2	0,023

Essai du 3.2.66

Tampon : véronal 0,07 M, Ph 8,6 albuminé à 2 mg/ml
Anticorps : Cob 10^B à la dilution finale au 1/1.600.000
Standard : 100 µl d'une sd.à 0,5 mµg/ml = 0,05mµg dans le tube
Trac. : Activité spécifique 466µc/µg - 0,1 mµg par tube.

IV - Les plasmas à doser

Ils sont étudiés à deux dilutions différentes. La valeur B/T ou B/F obtenue avec les plasmas doit être reportée à la courbe de standardsfaite le même jour pour connaître la concentration de l'hormone dans le plasma étudié.

RESULTATS ET DISCUSSION

I - Le marquage

Nous avons effectué 27 marquages dont les différentes modalités techniques et les résultats sont résumés dans le tableau N° 4.

Sur ce tableau nous pouvons constater :

1) Une meilleure activité spécifique après avoir réduit le volume initial de l'iode^{131} par évaporation :

Des études comparatives avaient déjà été faites par HUNTER et GREENWOOD sur un volume total de 300 et 100 µl, avec, dans ce dernier cas, une activité spécifique plus élevée. Par contre, il ne semblait pas utile de réduire le volume initial à 50 µl (34).

En ce qui nous concerne, l'iode^{131} est fourni par le Centre de SACLAY, en général à faible concentration

TABLEAU Nº 4

- TABLEAU DE MARQUAGE -

Date	^{131}I-Saclay concentration mc/ml	S.T.H.	Activ. Spécif. µc/µg	% Récupération en protéines	% Iode utilisé	Modalités techniques
10.3.65	13,8	BYLA	164	13,25	29,7	q.s technique standard :
7.4.65	20	BYLA	249	13	62	
		CHOAY	301	18	75	- 2 mc I - 5µg STH
19.5.65	19,4	CHOAY	233	33,7	58	-Colonne Séphadex 10 cm
		CHOAY	177	33	44	
9.6.65	12	CHOAY	150	42	37,5	
		CHOAY	78		20	
8.9.65	17	CHOAY	132	7,6	33,3	
		CHOAY	148	21,4	37,47	10µg STH
22.9.65	18	CHOAY	135	17	34,9	
		CHOAY	91			
13.10.65	10	CHOAY	178	24,8	44,6	
		CHOAY	167	23	41,8	
	n	CHOAY	194	33,4	48,4	Chl.T doublée
10.11.65	13,9	CHOAY	173	53,3	43,3	
		CHOAY	178	41,3	54,6	Evaporation ^{131}I sous courant d'air ½volume
1.12.65	33,3	CHOAY	189	29,1	47,2	
		CHOAY	372	27,4	46,5	4mc évapor.
		CHOAY	296	19,8	36,9	4mc sans évap.
5.1.66	10	CHOAY	385	11,8	48	4mc évaporat.
		CHOAY	412	18,34	51,8	
19.1.66	15,7	CHOAY	353	23	44	Col.Séphadex 20 cm
		CHOAY	355	32	44	
2.2.66	17	CHOAY	466	29,6	58,2	Col.16 cm
23.2.66	22	CHOAY	438	21,2	49,8	Col.20 cm
16.3.66	10	CHOAY	274	28	45,70	3 mc
		HUNTER GREEN-WOOD	274	26	45,74	Col.16cm Evap. système → 25 µl

(10 à 20 mc/ml) et l'évaporation est faite actuellement, de façon systématique, sous courant d'air sec à température du laboratoire jusqu'à ce que le volume initial de la quantité d'iode utilisé pour la réaction soit ramené à 25 µl environ; le volume total de la réaction est ainsi de 100 µl avant l'adjonction du métabisulfite de sodium.

2) Un marquage a été fait avec une dose double de chloramine T (200 µg). Nous avons obtenu, les autres conditions restant par ailleurs identiques, une activité spécifique plus élevée, et un rendement en protéine amélioré.

Nous préférons cependant pour les marquages de routine, adopter la technique HUNTER et GREENWOOD, tant pour la quantité de chloramine employée (100 µg) que pour la durée de son action, afin d'éviter une dégradation trop marquée de la protéine.

3) La colonne de séphadex G-50, permettant la séparation de l'hormone marquée de l'iode qui n'a pas réagi est préparée selon la technique de HUNTER et GREENWOOD, précédemment décrite.

Contrairement aux auteurs, nous obtenons toujours un pic d'iodure supérieur au pic d'hormone marquée (figure 7); la hauteur de la colonne (10, 16 ou 20 cm) n'influe pas sur les résultats. Des études sur Séphadex G-75 sont en cours.

4) L'hormone marquée est actuellement utilisée sans purification. Des essais de séparation sur gélose ou sur Séphadex G-150 sont en cours, mais les premiers résultats n'ont apporté aucune amélioration.

HUNTER et GREENWOOD utilisent également l'hormone marquée sans purification avec des résultats satisfaisants (96% de précipitation en excès de sérum anticorps).

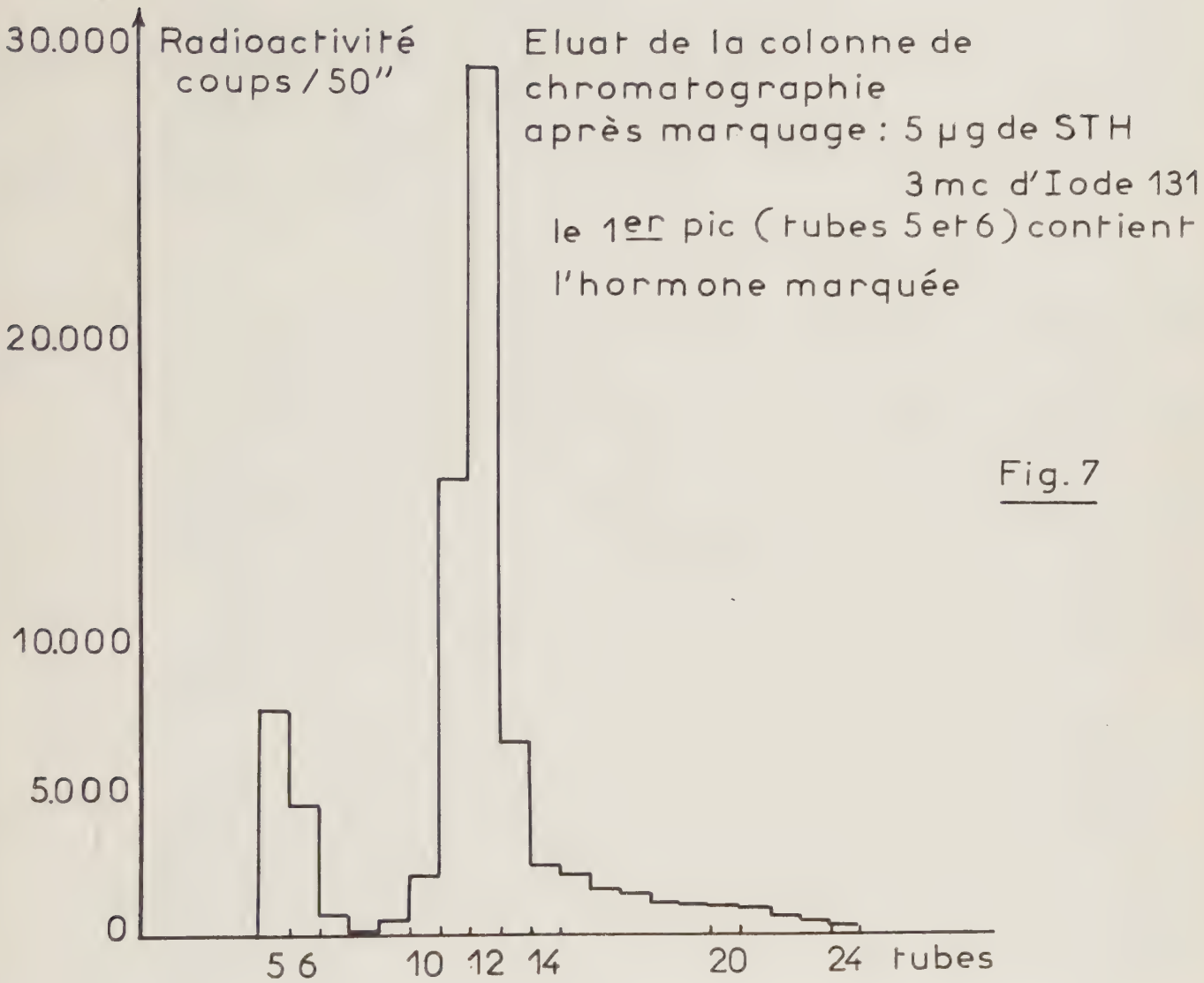

30.000
Radioactivité
coups / 50"
20.000
10.000
5.000
0
Eluat de la colonne de
chromatographie
après marquage : 5 µg de STH
3 mc d'Iode 131
le 1er pic (tubes 5 et 6) contient
l'hormone marquée
5 6
10 12 14
20
24 tubes

Fig. 7

La purification de l'hormone marquée par électrophorèse sur gel d'amidon (tampon borate 0,3 M Ph 8) est utilisée par GLICK, ROTH, YALOW et BERSON (28). La fraction d'hormone marquée éluée dans la région préalbumine du gel précipite complètement avec l'anticorps spécifique et est immunologiquement identique à l'hormone non marquée.

TCHOBROUTSKY et Coll. utilisent également pour l'hormone somatotrope iodée (^{131}I de Saclay) la purification par électrophorèse verticale sur gel d'amidon ou encore la filtration sur gel de dextran selon la technique de TOUBER et MAINGAY (96) : ces derniers utilisent des colonnes de Séphadex G-200 de 50 x0,8 cm Du tampon véronal 0,12 M Ph 8,6 est utilisé pour l'équilibration et l'élution. Pour le fractionnement de la seule hormone marquée, la saturation préalable de la colonne avec une solution à 0,1% d'albumine bovine minimise l'adsorption de la protéine iodée sur le gel.

Si les résultats obtenus par DAUGADAY en 1962 (98 par le procédé de distillation utilisé initialement par STAUB et Coll. (92) pour la préparation de glucagon, nécessitaient une quantité importante d'iode radioactif (10 à 20 mc) pour obtenir cependant une activité spécifique très basse (5 mc/mg), la technique proposée par HUNTER et GREENWOOD a permis des progrès considérables :

- l'activité spécifique théorique obtenue en utilisant 2 mc d'iode^{131} pour 5 µg de somathormone est de 400 µc/µg si l'utilisation de l'iode^{131} est de 100%. En pratique, le maximum d'utilisation de l'iode^{131} est, pour HUNTER et GREENWOOD, de 79% ce qui donne une activité spécifique comprise entre 250 et 300 µc/µg.

Une telle activité spécifique, facilement obtenue et suffisante pour permettre une utilisation pendant 15 à 20 jours, n'est cependant pas assez élevée pour permettre une altération de la protéine (le degré d'intégrité immunologique dépend essentiellement de l'activité spécifique; celle-ci ne doit pas dépasser 500 µc/µg).

- Le pourcentage d'iode utilisé que nous obtenons se situe aux alentours de 45%. Nous devons alors utiliser 3 à 4 mc d'iode pour obtenir l'activité spécifique nécessaire. Nous n'avons pas constaté de dégradation plus marquée de l'hormone ainsi iodée.

- Le rendement en protéine des marquages que nous avons effectué, est en moyenne de 25% (30 à 50%) pour HUNTER et GREENWOOD). Ce rendement est cependant suffisant : nous utilisons le 1/500 de l'hormone marquée ainsi obtenue. (Tableau 5)

MOYENNE DES RESULTATS OBTENUS LORS DES DIFFERENTS MARQUAGES

Radioactivité utilisée en mc	Activité spécif. Mc/Mg	% ^{131}I utilisé	Rendement en protéine %
2 (17)[a]	181,6	44,36	27,93
3 (2)	274	45,72	27
4 (10)	362,5	46,98	23,7

a) Entre parenthèses le nombre d'expériences.

Malgré un soin particulier apporté au cours des manipulations, il n'a pas été possible d'améliorer ces différents rendements.

Nous signalerons que le Centre de SACLAY ne fournit aucune précision sur le pourcentage d'iodate contenu dans la préparation d'iode^{131}, un pourcentage élevé d'iodate limitant l'activité spécifique (34).

Les derniers travaux de HUNTER et GREENWOOD proposent l'utilisation de l'icde^{125} (52).

Cet isotope a une demie vie de huit semaines (au lieu de 8 jours pour l'iode^{131}) et permet l'utilisation d'une hormone marquée à basse activité.

0,7 à 0,8 mc sont suffisantes pour marquer 5 µg de protéine avec une activité spécifique de 50 à 100 µc/µg. (voir tableau 6).

II - Les Immuns-Sérums

Si les 11 animaux immunisés ont bien supporté les injections, des incidents techniques, lors du prélèvement, ont permis la récupération de 4 sérums anticorps seulement.

Un cobaye, par contre, a pu être prélevé 3 fois à un mois d'intervalle et après injections de rappel.

L'étude des immuns-sérums se fait :

- dans un premier temps à concentration constante d'antigène (0,1 mµg d'hormone somatotrope iodée par tube d'incubation) et minime par rapport à la quantité totale d'anticorps (dilutions croissantes faites de double en double du 1/4000 au 1/8.000.000 final et parfois plus.

- dans un deuxième temps à concentration constante d'anticorps, déterminée par l'expérience précédente, pour des quantités croissantes d'antigène ajouté.

Le temps d'incubation pour que la réaction soit à l'équilibre varie entre 5 et 8 jours. Le temps nécessaire sera d'autant plus long que les dilutions sont plus poussées, les autres conditions, température, Ph,... étant par ailleurs constantes.

RESULTATS DONNES PAR LES PRINCIPAUX AUTEURS AYANT EFFECTUE LE MARQUAGE DE LA S. T. H.

Auteurs	Iode	* totale utilisé(mc)	% I* utilisé (c)	% * utilisé	Activ. Spécif. (μc/ μg)
UTIGER et DAUGADAY 1962 (a)	Na ^{131}I (U.C.NC-OAK) Ridge-Tenn				5 mc/mg
1964 (b)	"				200- 400
HUNTER et GREENWOOD	Na ^{131}I (amersham)	2	-	63,7 ± 8,6 (10)	255 ± 34 [d]
		2	66,2 ± 14 (8)	57,1 ± 13,8 (8)	228 ± 51
		4	-	46;5 ± 20 (25)	372 ± 163
1963 (b)		4	55,6 ± 11 (7)	47,9 ± 11,3 (7)	383 ± 90
1965 (b)	"	0,7- 0,8			50 - 100
ROTH,GLICK et Coll. 1963 (b)					400 - 500
TCHOBROUTSKY et Coll. 1965 (b)	Na ^{131}I Saclay	2 à 3		50 - 90	250 - 400

a - procédé de distillation de STAUB
b - technique de HUNTER et GREENWOOD
c - le % d'iode^{131} utilisé est calculé après correction du pourcentage d'iodate déterminé par électrophorèse
d - Moyenne arithmétique ± déviation standard
(entre parenthèses, le nombre d'expériences)

Les sérums ont tous été étudiés au 6ème jour pour les études à concentration constante d'antigène et au 8ème jour, pour les études à concentration constante d'anticorps.

Etude à concentration constante d'antigène marquée

- L'expression B*/T* ramenée en pourcentage de B* en fonction de la dilution de l'immun-sérum permet d'en déterminer la concentration en anticorps. Celle-ci dépend évidemment de l'importance de l'immunisation, mais encore de la réaction individuelle des animaux. Nous l'exprimons volontiers en donnant la dilution de l'anticorps qui fixe 50% de l'antigène. (Courbes 1.2.3.4.5.6)

- La relation entre le rapport B*/F* et la concentration du sérum,(c'est-à-dire la concentration de l'anticorps) est linéaire ce qui implique une hormone somatotrope monovalente (3-5-83). La pente de la courbe est liée à la variation de l'énergie accompagnant la réaction de l'anticorps avec l'antigène (courbe N° 7).

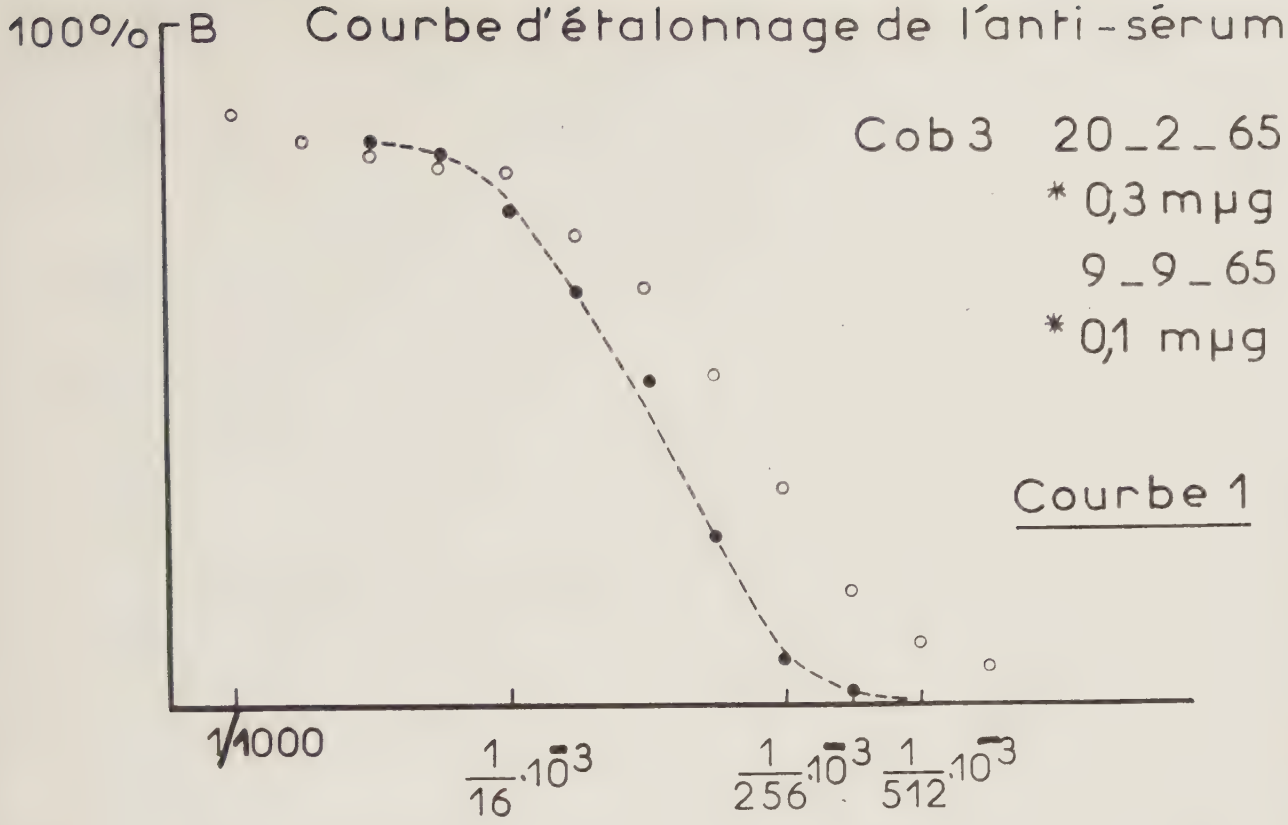
Etude à concentration constante d'anticorps

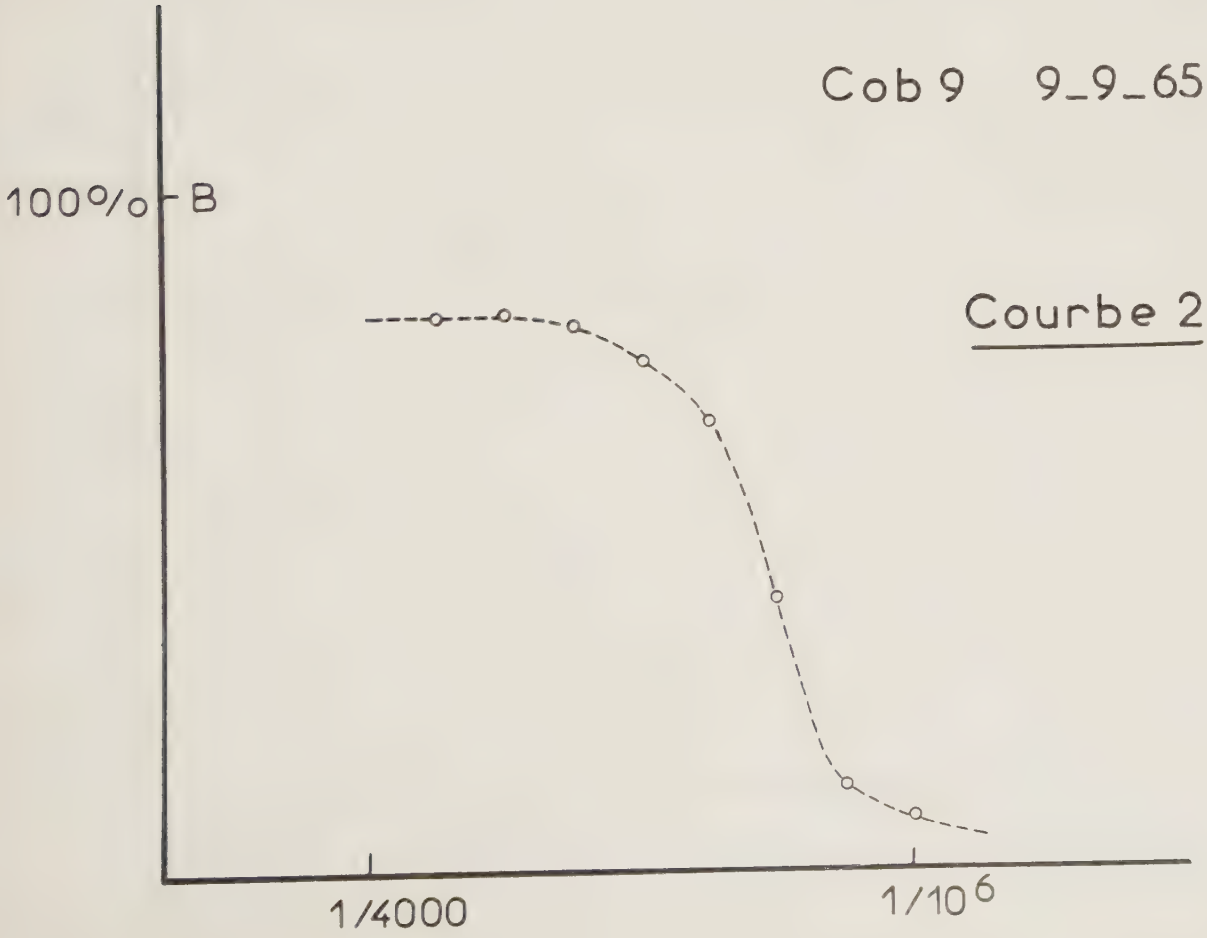
Les animaux ont été étudiés à concentration constante d'anticorps (déterminée par les expériences précédentes comme celle qui fixe 50% de l'antigène marquée) et concentration constante d'antigène iodé pour des quantités croissantes de standards. Cette étude permet :

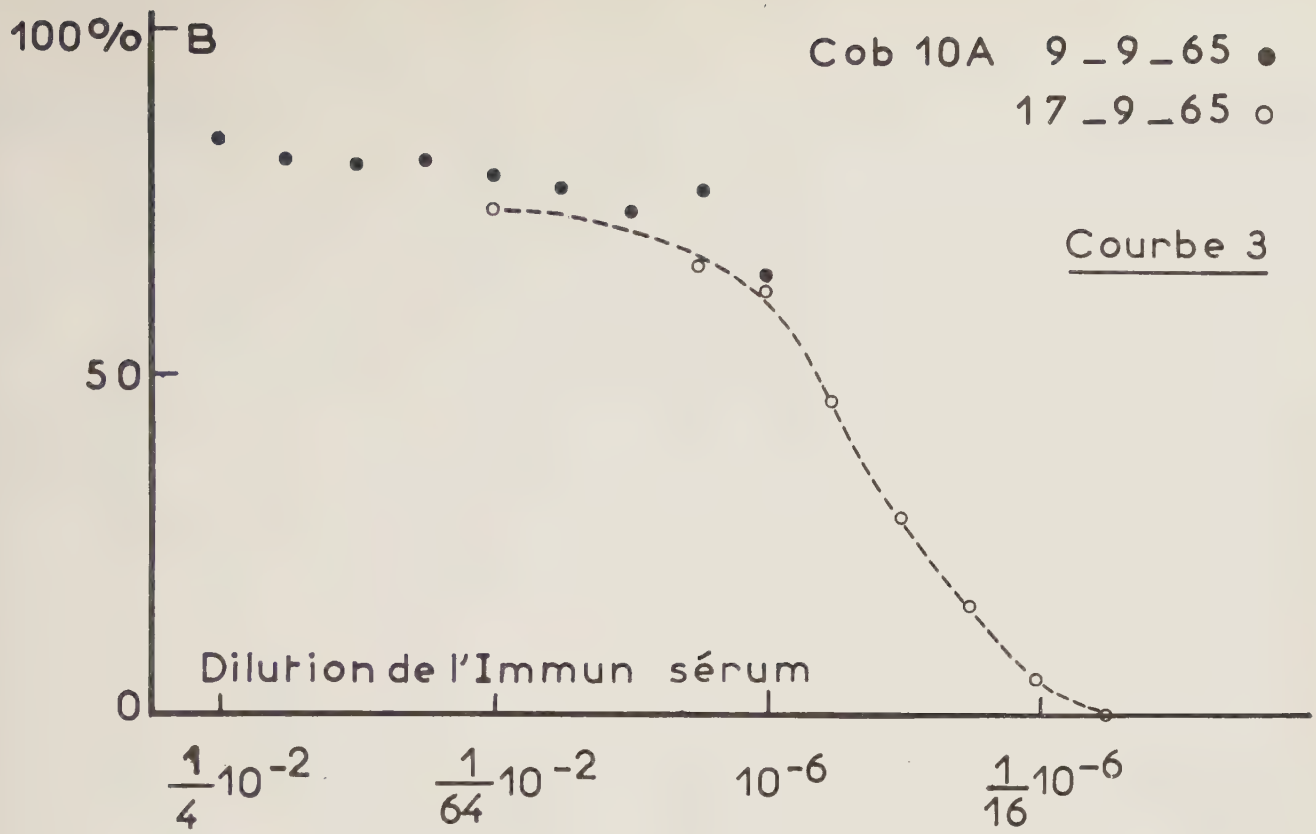
- d'étudier le nombre de sites d'anticorps existant dans un immun sérum
- d'établir les courbes de standards qui seront utilisées pour la détermination de l'hormone somatotrope plasmatique.

- Etude de l'immun-sérum :

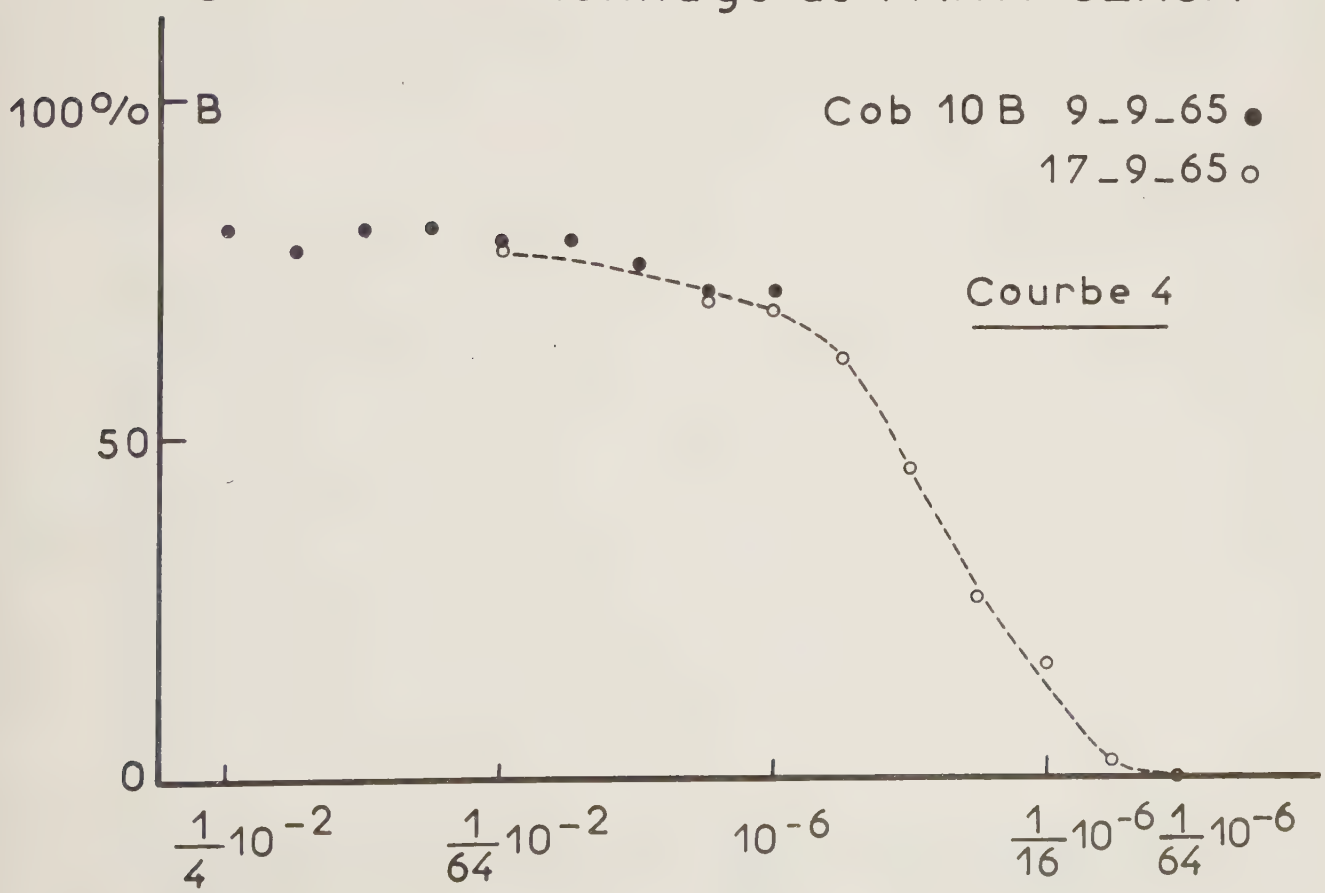
Le cobaye 10^B a été étudié à la dilution 1/1.600.000 avec une quantité de traceur égale à 0,1 mμg contre des quantités croissantes de "standard" (0,05 à 6,4 mμg).

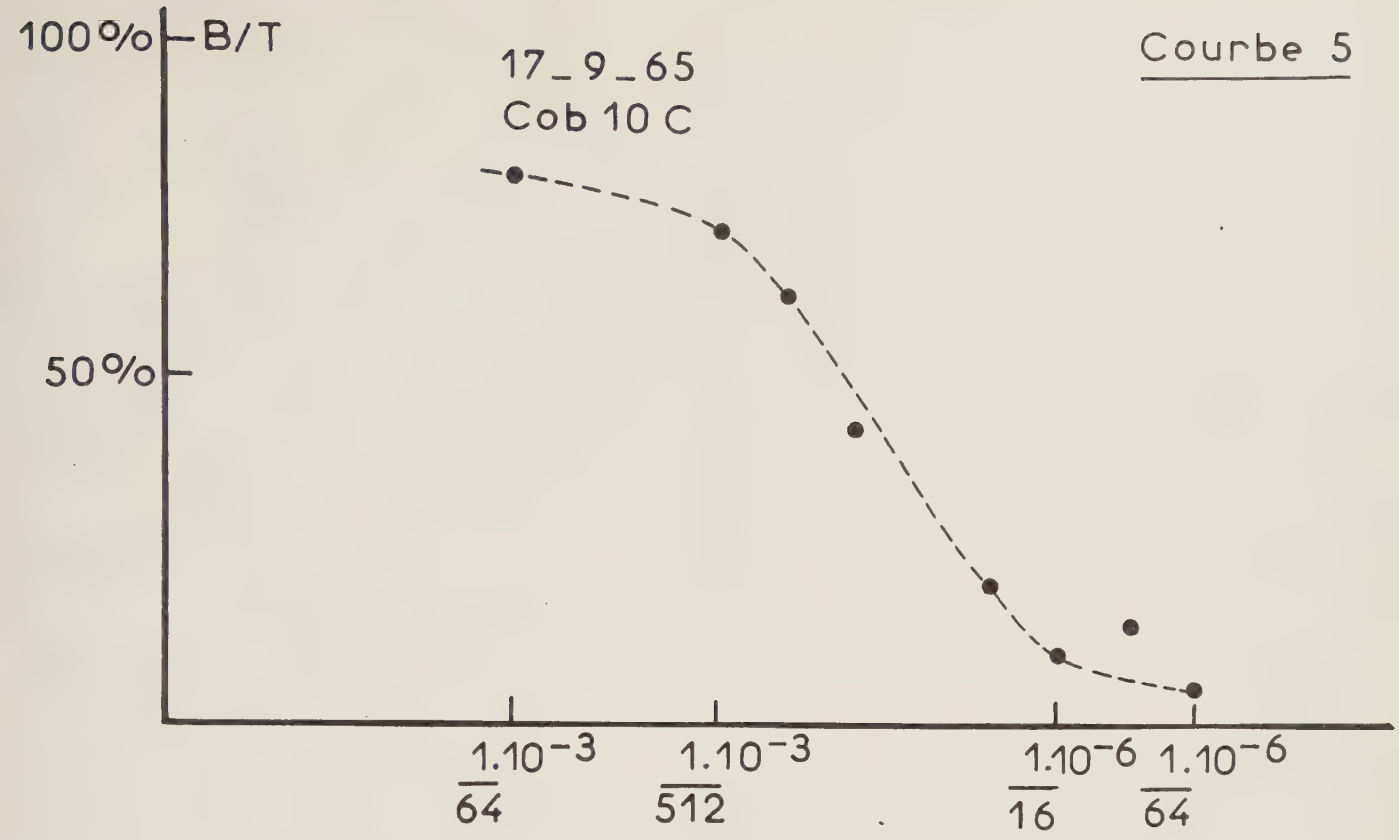

100% B
Courbe d'étalonnage de l'anti-sérum
Cob 3 20_2_65
* 0,3 mμg
9_9_65
* 0,1 mμg
Courbe 1
1/1000
1/16 .10⁻³
1/256 .10⁻³
1/512 .10⁻³


Cob 9 9_9_65
100% B
Courbe 2
1/4000
1/10⁶

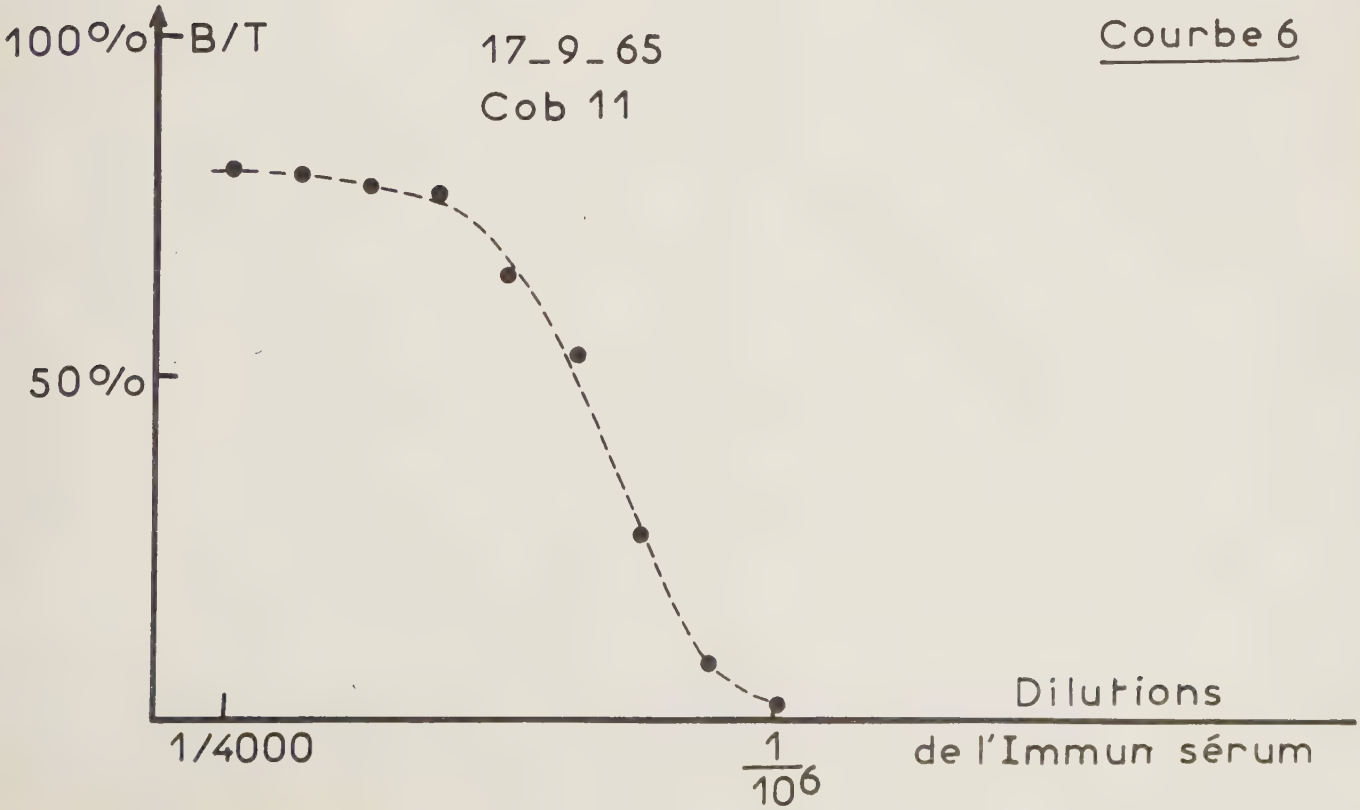


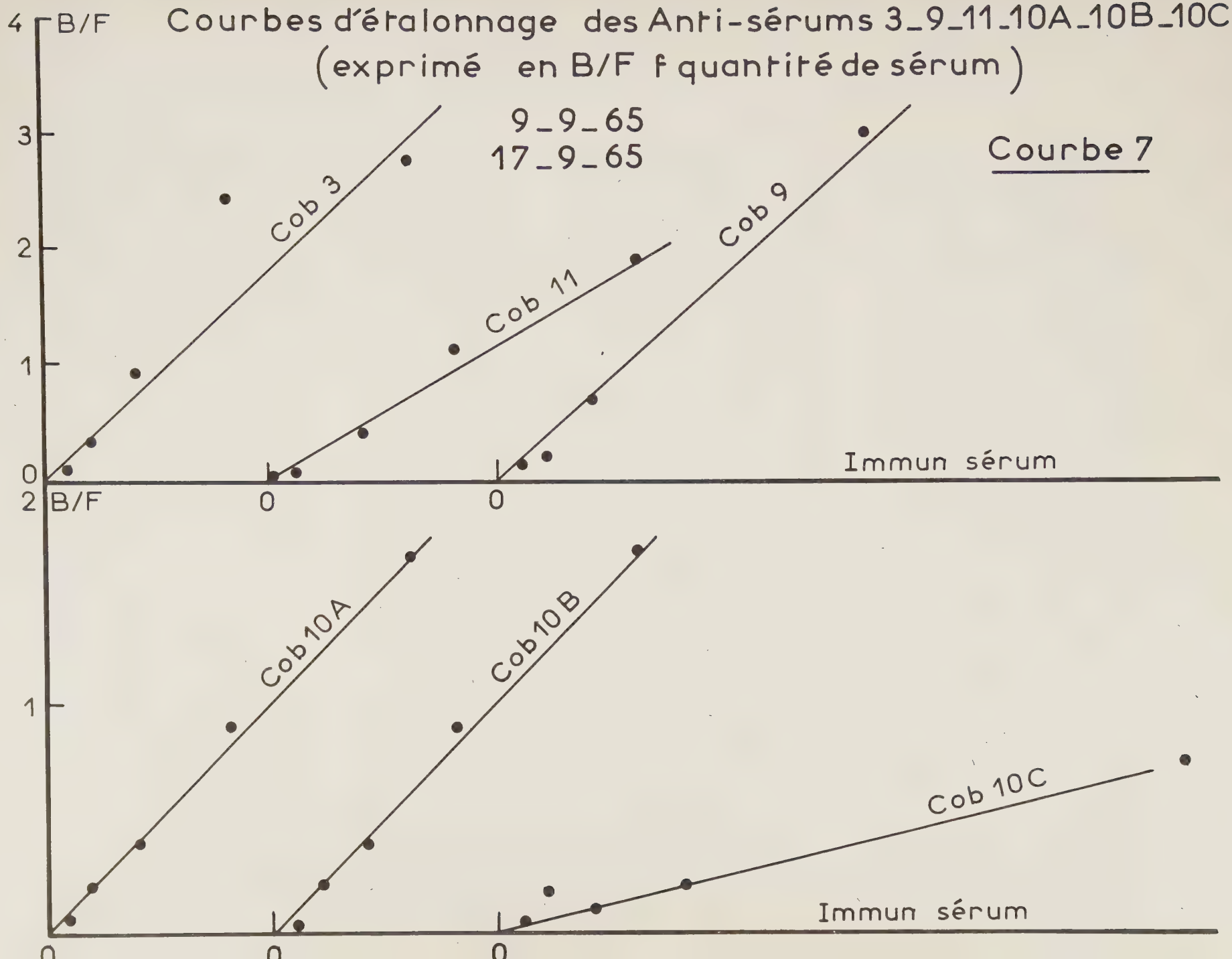
Courbe d'étalonnage de l'ANTI-SERUM





Courbe d'étalonnage de l'ANTI-SERUM




Courbes d'étalonnage des Anti-sérums 3_9_11_10A_10B_10C
(exprimé en B/F f quantité de sérum)
9_9_65
17_9_65
Courbe 7
4 B/F
3
2
1
0
Cob 3
Cob 11
Cob 9
Immun sérum
2 B/F
0
0
1
Cob 10A
Cob 10B
Cob 10C
Immun sérum
0
0
0

En exprimant le rapport B*/F*, en fonction de B réel, nous obtenons une courbe à concavité vers le haut (fig.8), ce qui veut dire, une fois admise la monovalence de l'antigène, la présence de plusieurs sites d'anticorps (3-5-83-86).

Les pentes des tangentes étant égales aux constantes d'équilibre des réactions entre l'antigène et chacun des sites de l'anticorps, il est possible de calculer la variation d'énergie libre, accompagnant la formation des complexes.(3-5-83-86).

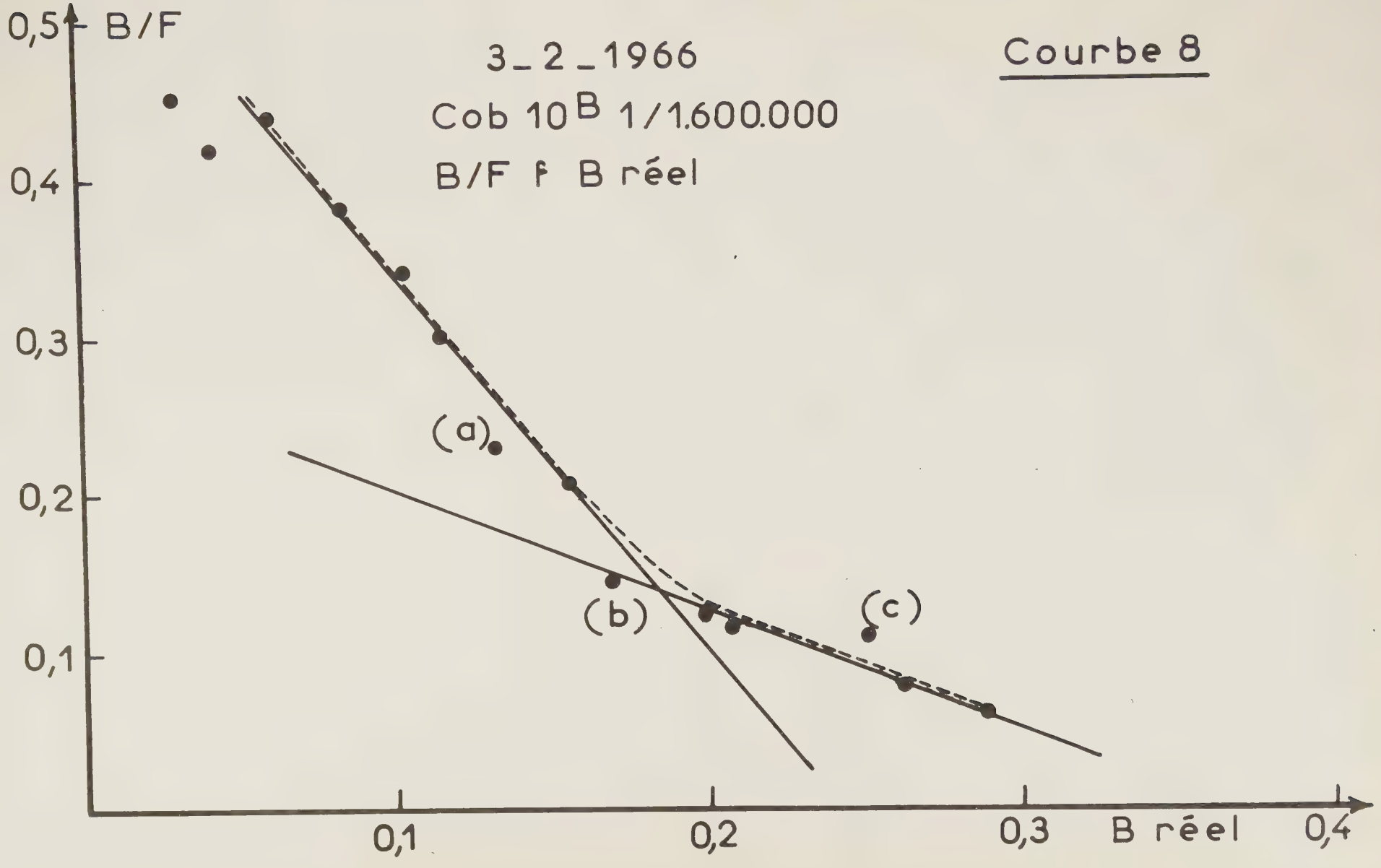
- L'établissement des courbes standards :

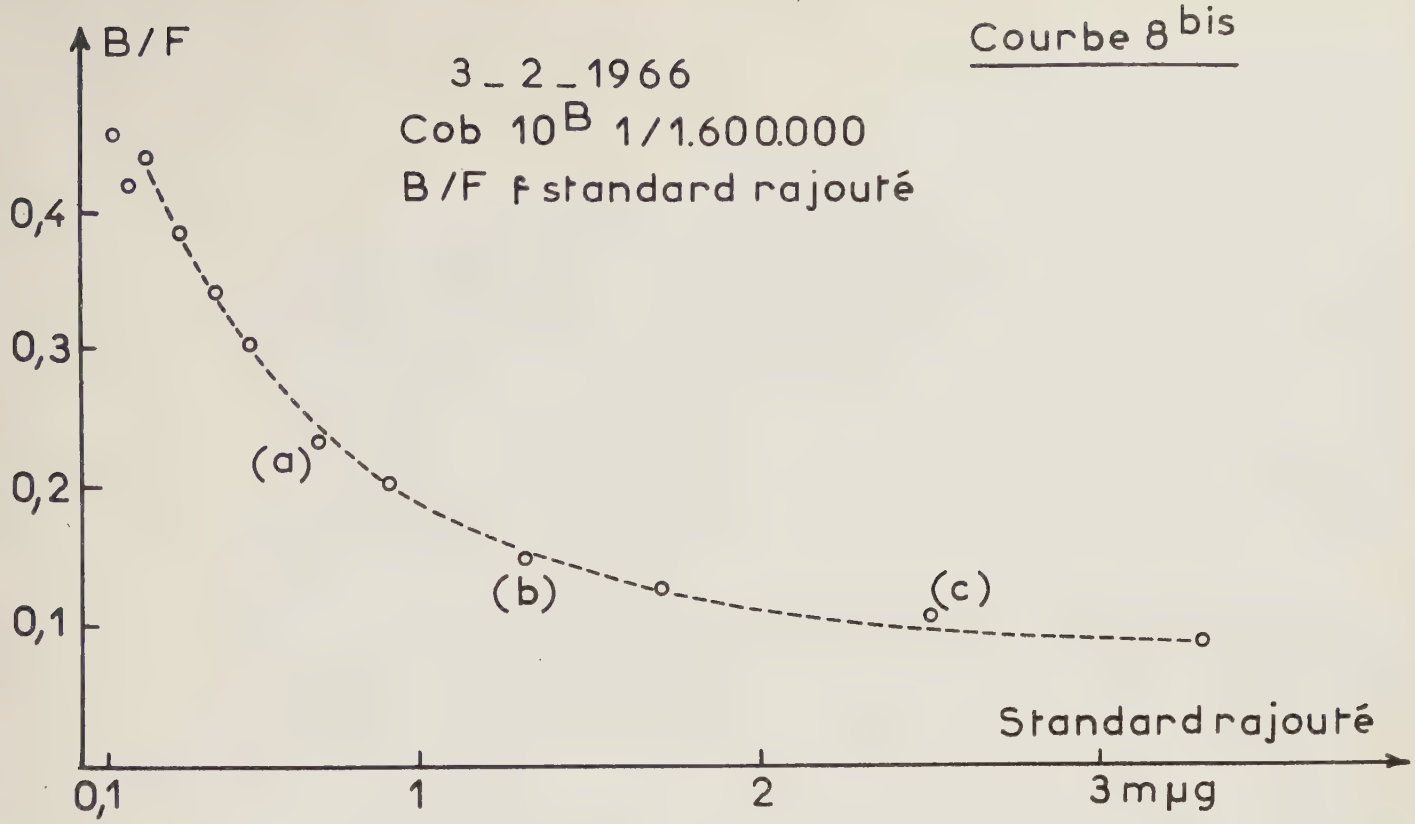
L'établissement des courbes standards se fait en exprimant le rapport B*/F* en fonction de l'antigène rajouté. BERSON et Coll. (5) ont démontré que la pente de cette courbe standard est d'un intérêt particulier puisqu'elle détermine la sensibilité et la précision du dosage et qu'elle est elle-même une fonction des variations de l'énergie libre standard accompagnant la formation du complexe hormone anticorps.

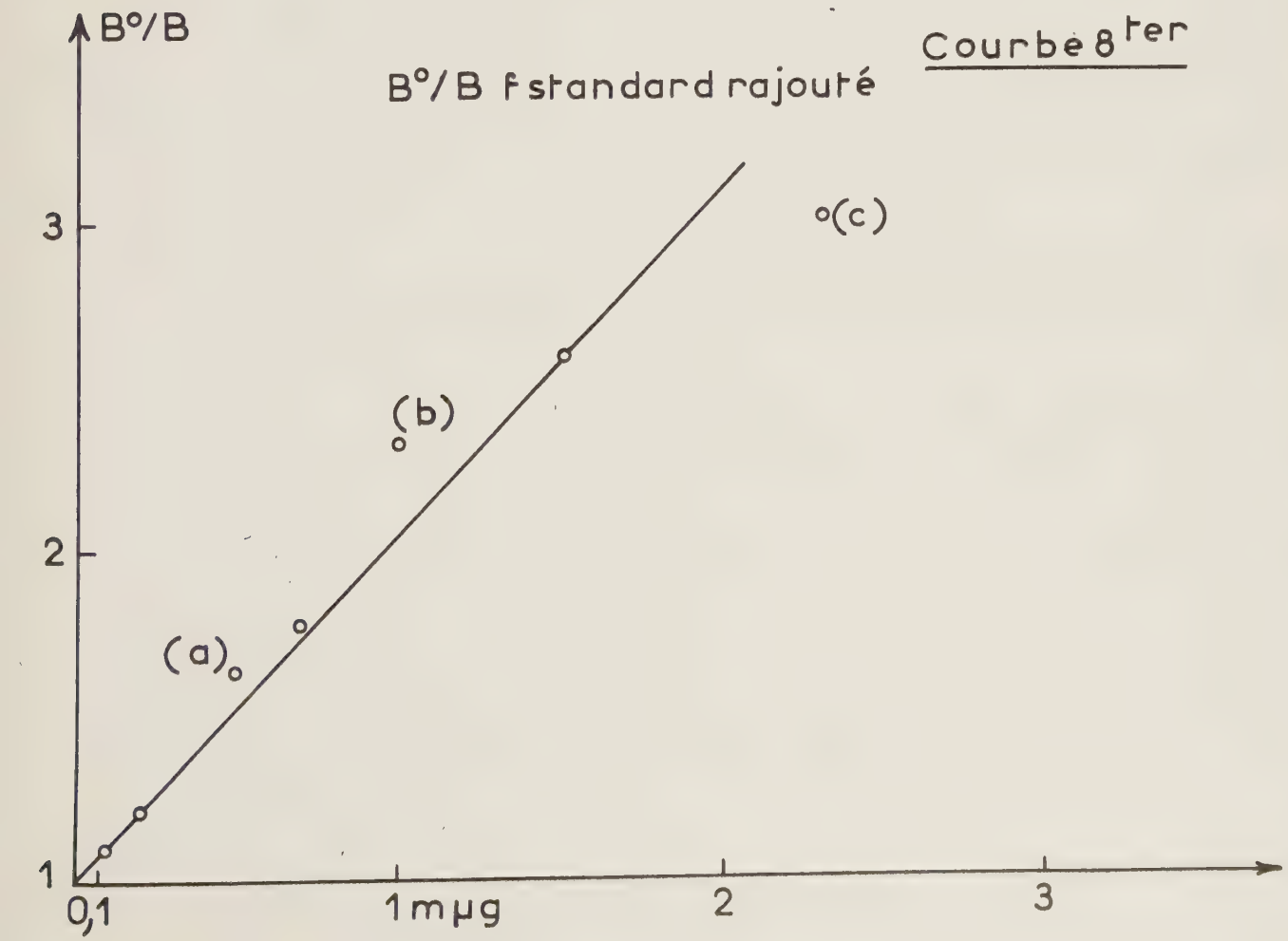
Il est connu,en effet, que l'énergie d'un immun-sérum dans sa réaction avec l'antigène varie avec les animaux donneurs même lorsque le schéma d'immunisation a été identique pour tous. Cette énergie n'a par ailleurs aucune relation avec la concentration de l'anticorps. Celle-ci peut être identique dans deux des sérums alors que leur énergie vis-àvis de l'antigène peut varier de 1 à 100.

Pour obtenir le maximum de sensibilité, il est donc important de choisir un système tel que B*/F* diminue rapidement pour l'adjonction de quantités faibles de standard (la dilution retenur pour le dosage est celle qui donne un rapport B*/F* initial compris entre 0,7 et 2) d'où l'intérêt d'immuniser un grand nombre d'animaux : indépendamment des risques opératoires, il sera facile de choisir parmi les sérums obtenus celui qui répond le mieux à ces conditions.

Courbe d'étalonnage anti-sérum




B/F
Courbe 8 bis
3_2_1966
Cob 10B 1/1.600.000
B/F f standard rajouté
0,4
0,3
0,2
0,1
(a)
(b)
(c)
Standard rajouté
0,1
1
2
3 mµg


B°/B
Courbe 8 ter
B°/B f standard rajouté
3
2
1
(c)
(b)
(a)
0,1
1 mµg
2
3

Nous avons pu constater des réponses variables, tant pour la concentration en anticorps que pour l'estimation de l'énergie des anticorps vis-à-vis de l'antigène chez des animaux qui avaient tous subi le même schéma d'immunisation.

Ainsi le cobaye no 3 au 1/512.000 fixe seulement 0,3% de l'hormone marquée, alors que le cobaye 10^C au 1/65.000.000 fixe encore 4%.

L'étude des sérums, à l'aide de l'expression B*/F* en fonction de l'anticorps met en évidence une courbe de plus grande pente donc une énergie vis-à-vis de l'antigène plus élevée chez les cobayes 3, 9, 10^A et 10^B.

Parmi ceux-ci, le cobaye 10^B est celui dont la concentration en anticorps est la plus forte. C'est donc lui que nous utiliserons préférentiellement puisque l'utilisation d'une dilution, la plus poussée possible, offre deux avantages :

a) une limite de l'interférence éventuelle des différents constituants du sérum dans leur réaction,

b) mais surtout la possibilité de diminuer au maximum la quantité d'hormone marquée dans le milieu d'incubation d'où une augmentation de la sensibilité.

Les dilutions utilisées par HUNTER et GREENWOOD, YALOW et BERSON se situent du 1/500.000 au 1/1.200.000

READ et BRYAN avaient déjà signalé l'importance de limiter le nombre d'injections lors de l'immunisation afin d'éviter la fabrication d'anticorps non spécifiques de l'hormone et l'on peut constater sur les courbes N° 5 et 7 que si le cobaye 10^C (8 injections) présente un taux considérablement élevé d'anticorps, ceux-ci n'ont qu'une énergie assez faible vis-à-vis de l'antigène.

Bien que le sérum soit conservé, non dilué et à -20°, nous avons pu constater après le 8ème mois une perte d'activité et un an après le prélèvement le cobaye 10^B est utilisé à la demi-dilution des premiers essais.

Nous concluerons cette étude sur les immuns-sérums en rappelant qu'elle peut être appliquée aux anticorps circulants chez les sujets traités par l'hormone de croissance humaine, avec des modalités techniques identiques, la même expression des résultats et les mêmes conséquences. Il n'est pas nécessaire d'insister sur l'importance d'une telle étude vis-à-vis de la conduite thérapeutique.

Nous avons eu l'occasion d'étudier ainsi le sérum d'une enfant atteinte de nanisme hypophysaire et traitée à l'hormone de croissance depuis 1961.

Une étude à concentration constante d'antigène marqué a permis de déterminer une concentration en anticorps négligeable (1/1000 final).

L'étude à concentration constante d'anticorps n'a pas été jugée nécessaire.

III - LA SEPARATION DU COMPLEXE "HORMONE MARQUEE + ANTICORPS"

Une des étapes les plus délicates du dosage est la séparation de l'hormone restée libre de celle qui s'est fixée sur l'anticorps, une fois la réaction à l'équilibre.

Deux techniques principales ont été proposées :

- la séparation par électrophorèse ou par chromatographie: (51) l'hormone fixée sur les γ-globulines immunes migre avec celles-ci;

- la précipitation secondaires des γ-globulines immunes (et par conséquent de l'hormone fixée) par un sérum anti γ-globulines (95-99).

A - Séparation par électrophorèse

Nous avons au départ utilisé la séparation en gélose.

Des études préalables ont été faites en faisant migrer l'hormone marquée, à forte concentration (1 mμg)

- soit seule
- soit en présence d'un excés anticorps (1/400)

Le produit d'incubation est déposé à 22 mm du bord de la lame côté cathode.

- L'emplacement de la ligne de départ a été déterminé expérimentalement. Il est fonction, en effet, de la migration des protéines et de l'électro-endosmose que la dialyse préalable de la gélose ne peut réduire complétement.

Ceci entraîne la migration de l'hormone libre vers l'anode, tandis que l'hormone fixée à l'anticorps se retrouve avec les γ-globulines, côté cathode.

- La quantité totale de protéine n'est pas sans influencer la séparation, il est nécessaire d'en déterminer la concentration optima.

Des études faites à concentration déjà importante de protéine (sérum au 1/400 final - Traceur 1 mμg) mettent en évidence une meilleure séparation sans l'adjonction de sérum de cobaye normal.

Cependant, aux dilutions très élevées utilisées pour le dosage (0,07 mμg de Traceur - Immun-sérum au 1/2000.000) la séparation, sans apport supplémentaire de protéine, se fait difficilement. Nous préférons alors ajouter au milieu d'incubation, avant l'électrophorèse, 50 μl de sérum de cobaye normal au 1/10. Ceci nous ramène approximativement à la concentration utilisée lors des études systématiques, et nous a donné des résultats satisfaisants.

- La durée de l'électrophorèse et le voltage employé ont été étudiés.

Il nous a paru préférable de ne pas dépasser 10 à 15 volts par cm. La séparation sera alors d'autant meilleure que la durée de l'électrophorèse est plus longue.

Ainsi, lorsque la gélose est coulée sur des lames de microscope (7,5 cm), une électrophorèse de 2 H, sous 75-90 volts nous a donné des résultats satisfaisants.

- Pour l'étude systématique, après électrophorèse, la gélose est divisée en 15 bandes de 5 mm; chaque bande est déposée dans un tube à hémolyse, centrifugée, * et comptée séparément.

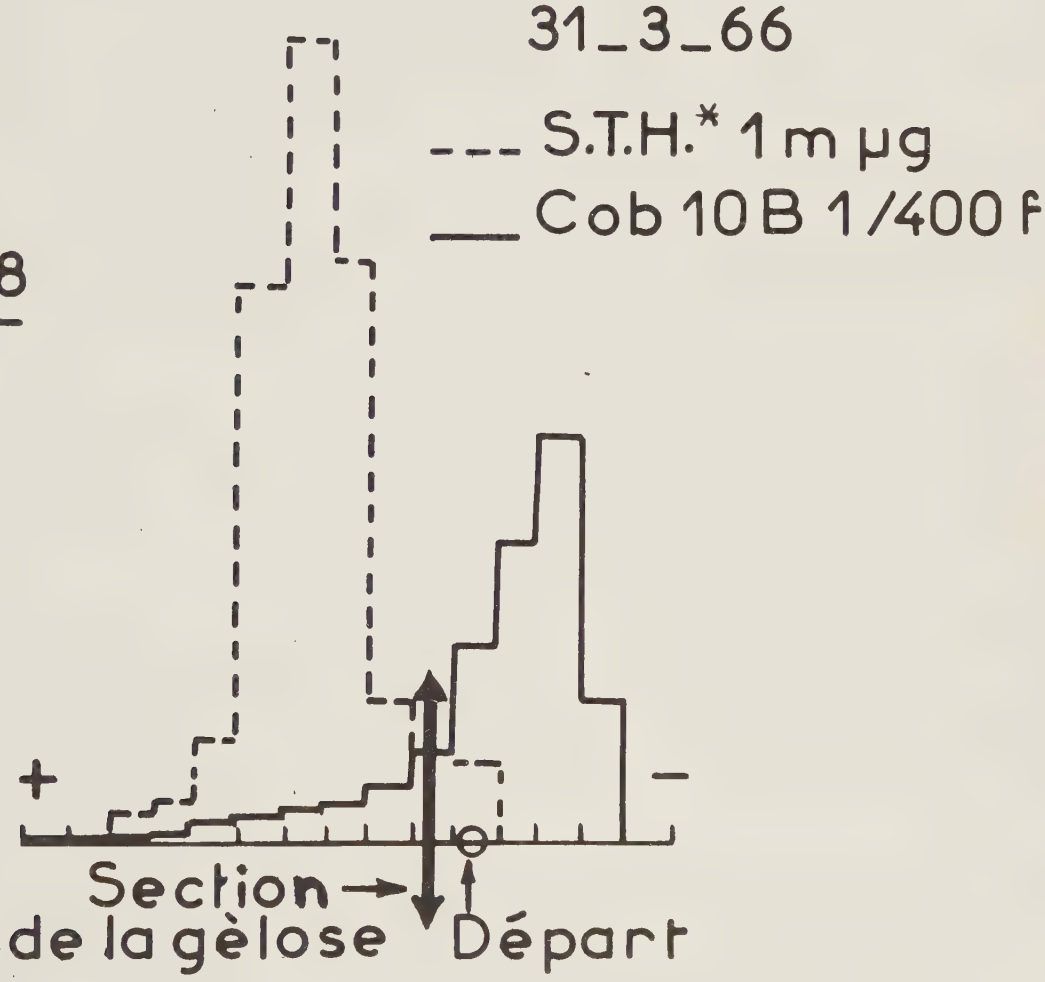
Nous pouvons voir sur la figure 8 qu'il est pratiquement impossible d'avoir une séparation totale entre les pics.

---

* Rappelons l'importance de l'homogénéité du milieu pour la précision du comptage des faibles quantités de radioactivité.

Electrophorèse en gèlose
Répartition de la radioactivité

Fig. 8



Conditions d'électrophorèse: 100 volts pendant 2 h

Dans les conditions d'électrophorèse déterminées ci-dessus, l'hormone seule, migre vers l'anode en un pic dont le sommet est situé à 20 mm de la ligne de départ, mais il persiste déjà sur celle-ci une certaine quantité de riadioactivité.

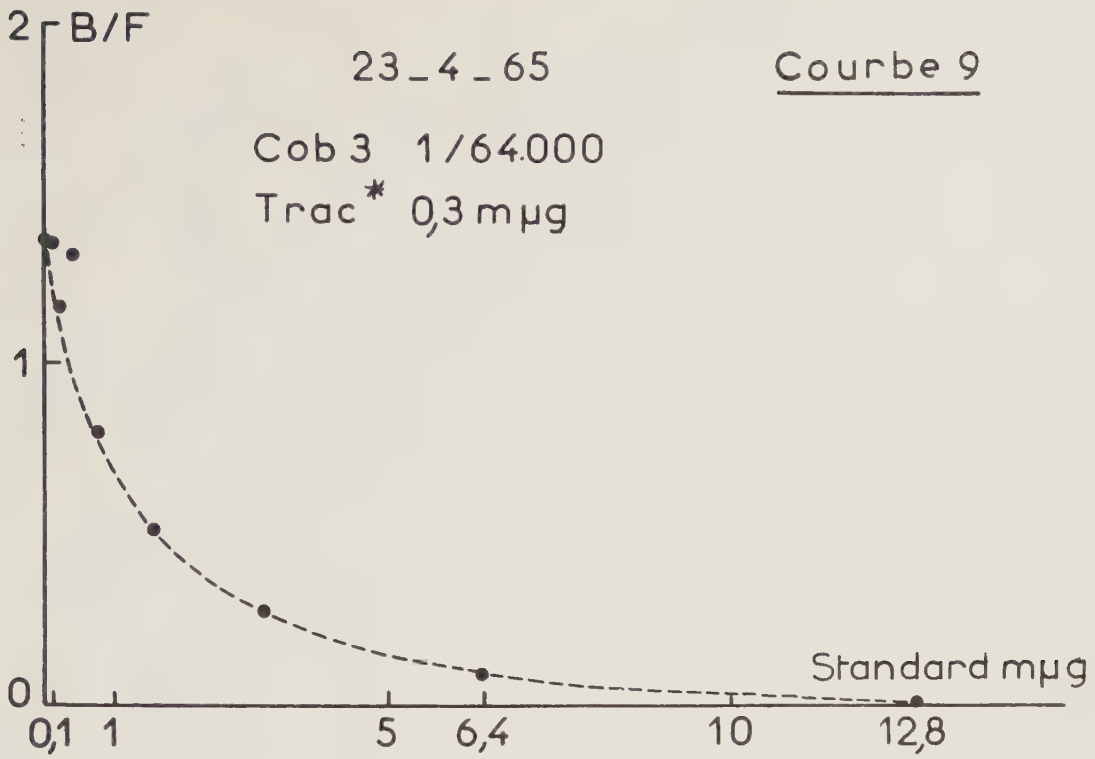
Par ailleurs, lors de la séparation d'un milieu d'incubation contenant l'immun-sérum, la radioactivité liée aux γ-globulines migre du côté cathode en un pic asymétrique, dont le sommet est à 10 mm de la ligne de départ, mais qui englobe nettement celle-ci en s'étendant vers l'anode.

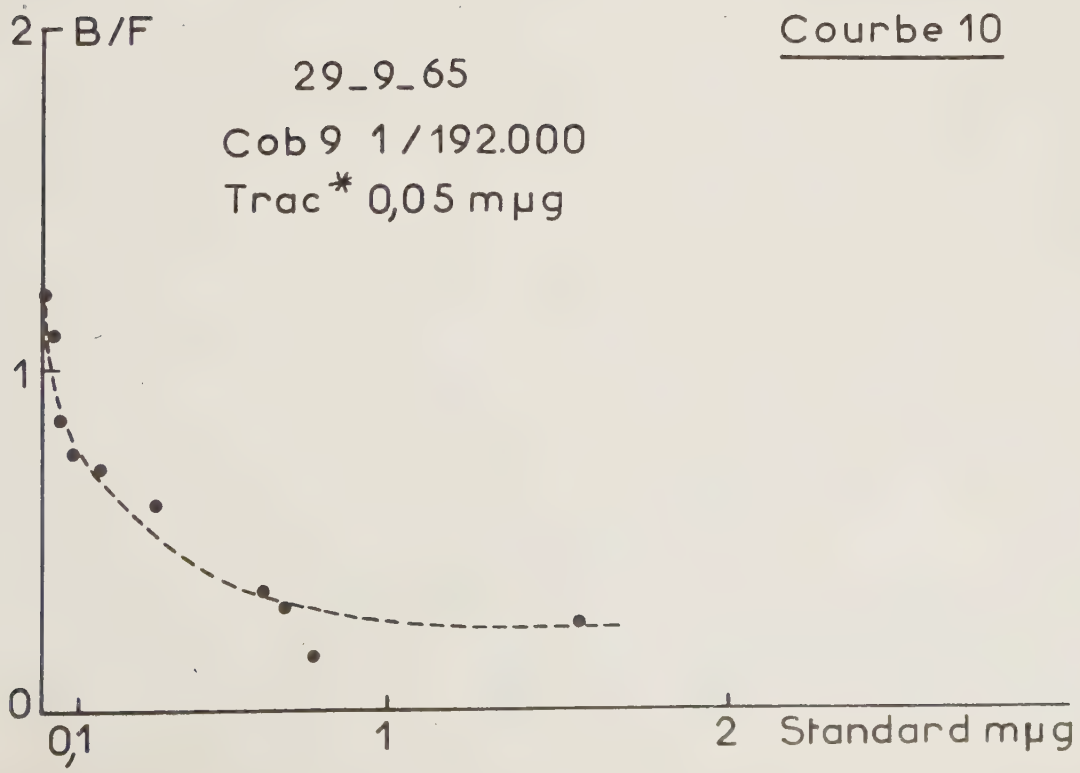
Pour les dosages de routine où l'on doit séparer les deux pics, nous avons convenu de couper la gélose à 5 mm de la ligne de départ côté anode. La radioactivité de chaque partie sera comptée séparément.

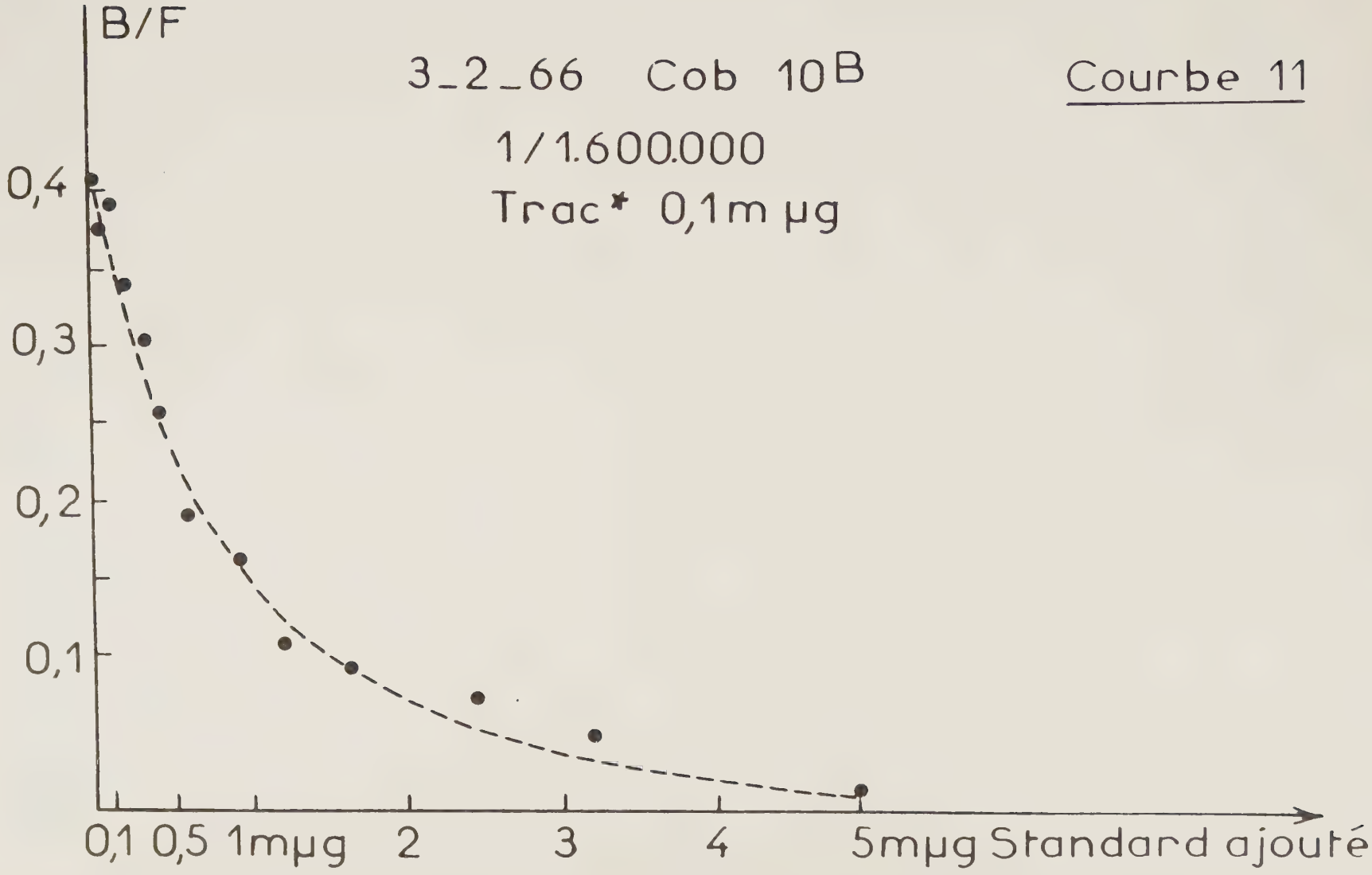
La fraction d'hormone libre qui reste sur la ligne de départ et qui sera par conséquent comptée avec l'hormone fixée aux γ-globulines, est couramment appelée " dénaturé " bien que le sens exact de ce terme ne soit pas déterminé.

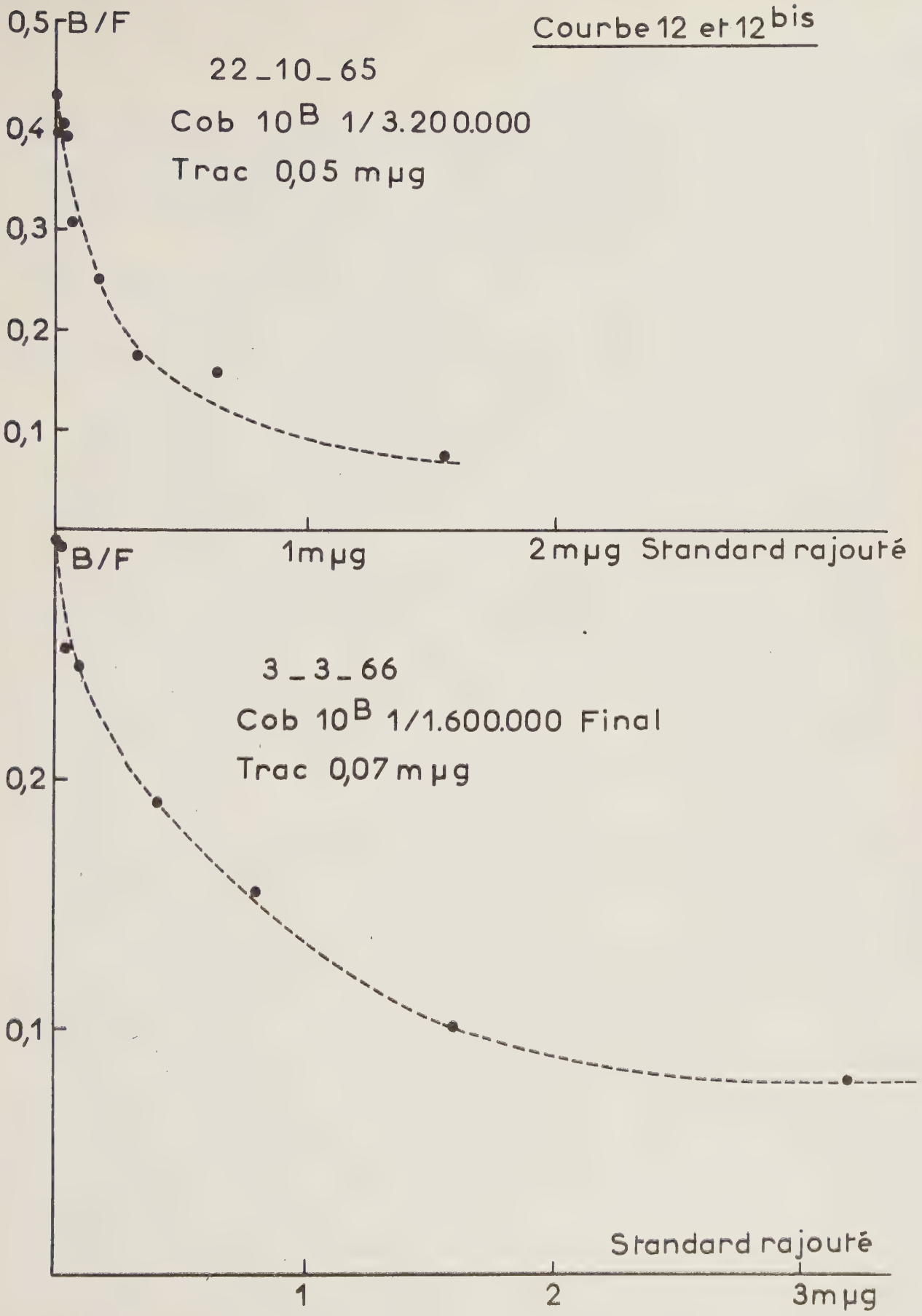
Il ne s'agit sans doute pas là uniquement d'une séparation insuffisante. En effet, les auteurs qui utilisent l'électrophorèse sur papier Whatman 3 MC, sur lequel l'hormone libre se fixe sur la ligne de départ, constatent que même en l'absence d'anti-sérum, une partie de la radioactivité (15 à 20%) migre comme une γ-globuline.

Une des explications possibles de ce phénomène pourrait être l'altération de la protéine par le marquage. Celle-ci varie de 15 à 35% (4-5) et est d'autant plus importante que l'activité spécifique est plus élevée. Mais la purification de l'hormone marquée sur gel d'amidon permet d'éloigner les fractions endommagées. Il s'agit plus vraisemblablement d'une altération de l'hormone par le plasma pendant la durée de l'incubation. Il apparaît alors certains fragments marqués


2
B/F
23_4_65
Courbe 9
Cob 3 1/64.000
Trac* 0,3 mμg
1
0
Standard mμg
0,1
1
5
6,4
10
12,8


2
B/F
Courbe 10
29_9_65
Cob 9 1/192.000
Trac* 0,05 mμg
1
0
0,1
1
2
Standard mμg


B/F
3_2_66 Cob 10B
1/1.600.000
Trac* 0,1m µg
Courbe 11
0,4
0,3
0,2
0,1
0,1 0,5 1mµg 2 3 4 5mµg Standard ajouté


Courbe 12 et 12 bis
22_10_65
Cob 10B 1/3.200.000
Trac 0,05 mµg
B/F
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
1mµg
2mµg Standard rajouté
3_3_66
Cob 10B 1/1.600.000 Final
Trac 0,07 mµg
B/F
0,2
0,1
Standard rajouté
1
2
3mµg

qui se lient de façon non spécifique à certaines protéines du sérum, principalement des α et des β-globulines par la libération d'une petite quantité d' ^{131}I sous forme d'iodide (4-5)

Un plasma dilué au 1/20 donne encore un dénaturé aux alentours de 10 % (4-5).

Lors de la séparation sur acétate de cellulose, 98% de l'hormone marquée purifiée libre migre vers l'anode.

Le "dénaturé" que nous avons observé lors de l'électrophorèse en gélose de l'hormone marquée seule, non purifiée, se situe aux alentours de 7%, souvent moins, exceptionnellement plus.

Ce dénaturé n'est pas augmenté avec la durée de l'incubation, ni par l'adjonction de sérum de cobaye non immune, aux dilutions usuelles de l'immun-sérum.

Il est possible que dans le cas rapporté ici, le dénaturé observé soit dû aux fractions de la protéine altérées par le marquage puisque l'hormone marquée est utilisée sans purification.

Par contre, dans les milieux d'incubation contenant du sérum de sujet à forte concentration (1/5), il a été constaté dans la plupart des cas une majoration du dénaturé.

Les protéines de sérum de cobaye immunes ou non immunes, à très fortes dilutions, ne provoquent pas d'altération supplémentaire de l'hormone pendant l'incubation.

En pratique, lors de la séparation en gélose, une lame témoin est faite à chaque dosage, afin de déterminer l'importance de la migration non spécifique de l'hormone et il n'en est tenu compte dans l'interprétation des résultats que si elle dépasse 4%.

Une lame témoin est faite pour chaque sérum de sujet puisque la sensibilité du dosage ne nous permet pas encore d'utiliser des plasmas très dilués.

Il s'agit là d'une technique empirique et si la séparation est loin d'être idéale, nous avons pu cependant obtenir des résultats reproductibles et satisfaisants.

Quelques essais sur papier Whatman 3 MC ont été tentés, mais les conditions optima de séparation ne sont pas encore déterminées.

B - Nous avons également tenté la précipitation de l'hormone fixée sur les γ-globulines de cobaye par un sérum de lapin anti γ-globulines de cobaye.

Nous rappellerons l'avantage de cette technique qui est essentiellement sa rapidité, tant pour la manipulation elle-même que pour l'évaluation de la radioactivité au moment du comptage puisque celle-ci peut se lire sur les 3/4 du liquide surnageant.

Nous n'avons pu cependant utiliser cette technique pour les dosages de routine, car la concentration en anti γ-globulines de cobaye du sérum de lapin que nous avons obtenu n'était pas suffisante.

Cette technique est utilisée par TCHOBROUTSKY et Coll. (95).

Le sérum de lapin est ajouté après 7 jours d'incubation; deux heures après, les précipités sont séparés par centrifigation.

La radioactivité, soit du précipité, soit d'une partie aliquote du surnageant, est comptée dans un compteur à scintillation.

Les courbes standards sont faites au moins en double, chaque échantillon est mesuré à trois dilutions différentes.

La sensibilité est de 0,3 m μg/ml.

Les auteurs travaillent sur plasma entier.

DAUGADAY, cependant signale une précipitation non spécifique due aux protéines du plasma, lorsque celui-ci est utilisé brut. L'extraction de l'hormone par chromatographie sur Amberlite IRC-50 lui permet d'éloigner ce facteur.

La sensibilité de la méthode est de 0,2 mμg.

YALOW et BERSON ont donné une explication possible de ce facteur non spécifique, que ne mentionnent pas les auteurs utilisant la séparation en électrophorèse:

La compétition entre l'hormone à doser et l'hormone marquée se manifeste comme une diminution de la précipitation de l'hormone marquée lors de l'adjonction du sérum anti γ -globulines

On ne peut dire s'il s'agit d'une réaction entre l'antigène(S T H) et l'anticorps (anti S T H) ou l'anticorps (γ -globulines de cobaye) et le sérum "anti-anticorps"

On pourrait prendre pour de l'hormone libre la fraction endommagée lors de l'incubation, puisque ce système de précipitation ne peut faire la différence entre les fractions endommagées et l'hormone libre non dénaturée.

Ainsi, même en l'absence d'hormone de croissance les altérations dues à l'incubation et les facteurs non spécifiques d'inhibition ne pourraient être distinguées.

Aussi, malgré la simplicité apparente de cette technique, la séparation par électrophorèse nous semble préférable puisqu'elle permet une détermination facile de l'hormone libre et non endommagée.

Il n'est pas signalé d'inhibiteurs non spécifiques et les résultats trouvés sur le plasma extrait ou brut sont concordants.

Il est peut être préférable, dans la mesure du possible, d'éviter l'extraction de l'hormone à partir du plasma car il s'agit là d'une manipulation assez longue (quels que soient les procédés utilisés) et nécessitant au minimum 4 ml de plasma. (51-99)

L'extraction présente cependant l'avantage de pouvoir augmenter, indirectement, la sensibilité du dosage plasmatique, en permettant une concentration de l'hormone à doser dans le tube de réaction.

IV - LES COURBES STANDARDS

A - RESULTATS

La reproduction de quelques courbes standards est fournie par les figures N° 9-10-11-12-12bis. après la page 6

Elles sont obtenues avec trois concentrations différentes de "traceur" ajouté au milieu d'incubation :

- 0,3 m µg par tube
  - l'anticorps utilisé (Cob.9) est à la dilution au 1/64.000
  - la gamme de standard rajouté est de 0.- 0,1- 0,2- 0,4- 0,8- 1,6- 3,2- 6,4- 12,8 m µg.
- 0,1 m µg par tube
  - L'anticorps utilisé (Cob.10^B) est à la dilution au 1/1.600.000
  - la gamme de standard rajouté est de 0- 0,05- 0,1- 0,2- 0,3- 0,4- 0,6- 0,8- 1- 1,2- 1,6- 2,4-3,2m µg.
- 0,05 m µg par tube
  - L'anticorps utilisé (Cob.10^B) est à dilution au 1/3.200.000
  - La gamme de standard rajouté est de 0- 0,01- 0,02- 0,04- 0,08- 0,1- 0,16- 0,32- 0,64- 1,28 m µg.

Les résultats sont exprimés de façon générale, à l'aide de l'expression B*/F*, en fonction du standard rajouté, et la courbe ainsi obtenue est une exponentielle.

Des résultats reproductibles ont été obtenus, quelque soit la quantité de "traceur" utilisé pour une dilution de l'immun-sérum donnant, en l'absence d'hormone standard, un B*/F* compris entre 1 et 2.

Le seuil de sensibilité est de 0,2 m µg.

Il nous a été possible d'abaisser le seuil de sensibilité jusqu'à 0,05 mμg, en utilisant 0,05 ou 0,07 mμg de traceur à condition de travailler sur une dilution de l'immunsérum telle que B*/F* soit compris entre 0,3 et 0,9 en l'absence de standard. Un seuil de sensibilité de 0,05 mμg permet dans les conditions actuelles d'expérience, la détermination de 0,5 mμg/ml de plasma.

Encore faut-il des conditions particulièrement favorables : le début de la courbe est parfois ininterprétable, le point "standard 0" étant situé souvent plus bas que les premiers points de décrochage (0,01 à 0,08). Nous n'avons pour ce phénomène aucune explication.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux de UTIGER (seuil de sensibilité 0,2 mμg), TCHOBROUTSKY et Coll.(0,3 mμg) et dans les cas favorables à ceux de HUNTER et GREENWOOD (0,07 mμg/ml $\pm$ 50 % pour des estimations faites en double *).

B - DISCUSSION

a) Sensibilité

Nous avons vu lors de l'étude des immuns-sérums qu'ils étaient un des facteurs de la sensibilité du dosage par

- leur énergie vis-àvis de l'antigène déterminant la pente de la courbe des standards;

- leur concentration en γ-globulines immunes, permettant leur utilisation à dilutions très élevées.

---

* Sensibilité donnée par les auteurs.

- L'activité spécifique de l'hormone marquée doit être suffisante pour permettre l'utilisation d'un "traceur" à très basse concentration, mais avec cependant un taux de comptage qui satisfait la précision statistique.

- En ce qui concerne la technique elle-même, rappelons une durée d'incubation suffisante, à 4°C, (5 à 10 jours) et le choix d'une technique de séparation le plus précise possible.

Une double raison fait désirer une sensibilité la plus élevée possible :

- les concentrations basses de somatotrope dans le sang

- mais surtout l'influence possible des protéines du plasma sur l'antigène marqué, influence qui nécessite l'utilisation d'un plasma dilué au 1/20ème.

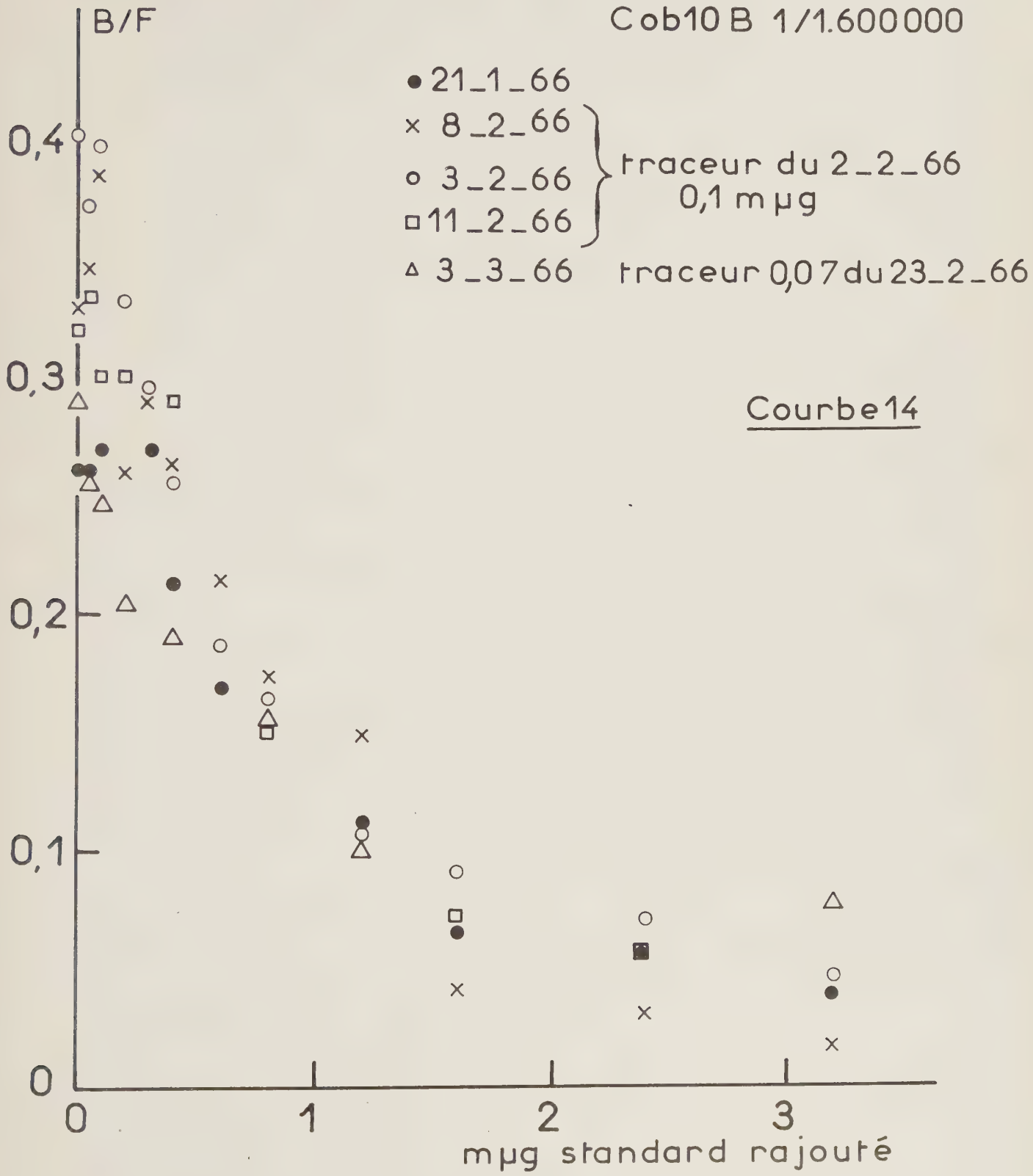
- Ainsi HUNTER et GREENWOOD rapportent une sensibilité de 0,07 m μg/ml pour les solutions de standard et de 0,22 mμg/ml pour l'estimation de la somatotrope plasmatique. La sensibilité de la méthode est telle qu'elle leur permet de détecter 0,5 à 1 mμg/ml de plasma (52).

Les dosages que nous sommes en mesure d'effectuer actuellement se situent dans les limites de la sensibilité nécessaire.

a) <u>Précision</u>

La précision de la méthode a été étudiée sur trois courbes qui ont pu être établies dans des conditions analogues (Anticorps : Cob.10^{B} au 1/1.600.000 - Traceur 0,1 mμg par tube- Echelle de standard : 0- 0,05- 0,1- 0,2- 0,3- 0,4- 0,6- 0,8- 1,2- 1,6 mμg par tube).

Courbes standards établies avec le même Anti-sérum et la même S.T.H. standard



Les résultats des courbes expérimentales ont été exprimés en B^c/B f du standard rajouté; dans ces conditions la relation est linéaire (B^o est la quantité de traceur lié, pour le standard 0)

L'index de précision λ a été calculé sur ces données.
($\lambda = S/b$ S = dispersion des points expérimentaux par rapport à la droite B /B f du standard rajouté. b = pente de cette droite)
Calculé sur 27 points expérimentaux : $\lambda = 0,22$.

c) Spécificité

Pour que le dosage soit valable, il est nécessaire de démontrer :

- que la réaction étudiée est bien la mise en évidence d'une réaction " antigène-anticorps ".
- que l'hormone ajoutée au plasma, in vitro ou in vivo, réponde de façon parallèle à ce que l'on attend.
- enfin que l'hormone endogène mesurée dans le plasma possède les mêmes propriétés que l'hormone de croissance.

Dans le système que nous étudions, l'hormone de croissance utilisée pour l'immunisation des cobayes et celle utilisée comme antigène dans la réaction, ont été extraites par des procédés et des laboratoires différents (les deux préparations possèdent la même activité biologique).

L'immuno-électrophorèse ne donne qu'une seule ligne de précipitation.

- Il existe une diminution identique du rapport B*/F* en fonction de l'hormone rajoutée, que celle-ci soit marquée ou non marquée à l'iode^{131}.

- La diminution de B*/F* en fonction des quantités croissantes d'hormone rajoutée au plasma est linéaire.

- Enfin la diminution de la concentration de la somatotrope plasmatique, mesurée par référence à la courbe standard, chez un sujet acromégale (diagnostic clinique évident) décroît linéairement avec le facteur de dilution du plasma.

Nous avons mentionné, au cours d'un précédent chapitre, qu'après beaucoup de controverses, l'unicité de la réaction "antigène-anticorps" dans le système étudié a été refusée. L'hormone de croissance dite purifiée, n'est en fait ni pure, ni spécifique.

Rappelons que HAYASHIDA (45), dès 1962, signale l'interférence de la prolactine dans l'estimation de la somatotrope plasmatique, par la technique de READ. JOSIMOVICH et MAC LAREN (54) rapportent qu'il existe dans les extraits placentaires, un matériel réagissant avec les immuns-sérums anti-somatotrope.

Mais YALOW et BERSON affirment que la contamination de l'hormone standard ne peut interférer sérieusement dans le dosage radio-immunologique : si seule, l'hormone de croissance est significativement marquée à l'iode^{131}, la précipitation du produit radioactif est fonction de la seule inhibition compétitive spécifique de l'hormone.

Enfin, la sensibilité actuelle de la méthode permet l'utilisation d'un plasma dilué au 1/20ème, diminuant l'altération de l'hormone marquée par les protéines plasmatiques. La séparation par électrophorèse qui a, sur la séparation par double précipitation, l'avantage de pouvoir mettre en évidence le "dénaturé" possible, n'a jamais permis de mentionner l'existence d'inhibiteurs non spécifiques dans le plasma lorsque celui-ci est dilué au 1/20 final.

C - APPLICATION AU PLASMA

Le dosage radioimmunologique apparaît donc comme une technique sans difficulté majeure, d'une spécificité suffisante et dont la sensibilité permet d'envisager le dosage de l'hormone de croissance dans le plasma humain.

Les premières estimations faites par HUNTER et GREENWOOD sur des échantillons de plasma normal ou pathologique sont en accord avec ce que laissait supposer la clinique ou les effets connus biologiques et physiologiques de l'hormone de croissance.

Ainsi il existe un taux d'hormone somatotrope plasmatique plus élevé chez les nouveaux-nés et durant l'adolescence où la croissance est rapide (52-53); cette augmentation est constante et marquée chez les acromégales.

Des résultats superposables sont donnés par GLICK et Coll. (28) qui utilisent les mêmes principes de base mais avec des différences dans la pureté de l'hormone standard, la purification de l'hormone marquée, la durée de la période d'incubation et la technique d'électrophorèse.

La mise en évidence d'une différence entre l'adulte normal et les sujets hypophysectomisés ou insuffisants hypophysaires, sur un seul échantillon de plasma est difficile. La concentration de l'hormone somatotrope plasmatique chez les sujets normaux se situe souvent à la limite de la sensibilité de la technique et est d'autant plus difficile à préciser qu'elle est fonction de l'heure, du prélèvement et de l'état de jeûne du sujet (GLICK, ROTH et Coll. ont mis en évidence que l'hypoglycémie, physiologique ou provoquée, est un puissant stimulant de la sécrétion hypophysaire de l'hormone de croissance (29).

Les résultats des premiers auteurs s'étant intéressés au dosage de l'hormone de croissance sont résumés dans le tableau N° 7.

TABLEAU N° 7

TAUX DE S.T.H. PLASMATIQUE (mμg/ml) DETERMINE PAR LES PREMIERS AUTEURS

Auteurs	Technique et Sensibilité	Acromégalie	Ad. Normaux	Enf. normaux	Adolesc.	Nanisme non hyp.	Insuff. hypophys.
GLICK & Coll. 1963	-Electrophorèse (DEAE) - Plasma entier - 0,1 m μg/ml		5 (212)	2-8,5 (4)			
UTIGER 1964	-Double précipitation -Extraits de plasma - 0,2 m μg	9,1 - 59	2 -9,2 (16) (moyenne 4,1)	3,3 -6,8 (12) moyenne (4,4)		2,3-10 (12)	0-3 (4 insuf.idiop) 0-2 (2) craniopharyng. 3,2-4,6 (2) aden.chromop.
HUNTER ET GREENWOOD	-Electrophorèse sur acétate de cellulose -extraits de plasma - 0,07 m μg/ml	72,3 ± 69,3 (23)	0,55 ± 0,68 (13)	18,6 ± 12,5 (10 1an) 8,5 ± 7,8 (26 de 1 à 8ans) 2,8 ± 2,8 (14 de 9 à 10ans) 14 ± 13,4 (34 de 11 à 17ans)			
HARTOG et Coll. 1964	-Double précipitation -Sérum brut -0,1 à 0,2 m μ g (1 à 2 mμg/ml sérum)		1,5 - 12(7)				
TCHOBROUTSKY et Coll. 1965	-Double précipitation -Plasma entier - 0,3 mμg/ml	240 (1) 3 H. après insuline	6 - 8 (1) a 14 - 25 (1)				
HUNTER et Coll. 1966	-Electrophorèse -125I - 0,5 à 1 mμg/ml de plasma	10 -30 [b] 20-130	0,52 ± 0,46[b] (41 échantillons de plas chez 6 adult.	4,28 ± 7,14[b] (142 échant. de plasma chez 9 enfants			

- Entre parenthèses le nombre de sujets étudiés
- a : même plasma étudié à des dilutions différentes
- b : prélèvements multiples chez un même sujet au cours de la journée

Nous avons pu personnellement étudier :

- 4 cas d'acromégalie :

NOM - AGE	OBSERVATION	STH mμg/ml de plasma (1)
BOU.. 32 ans	Acromégalie non traitée Evolutive depuis 1961	200 à 480 (7) M = 324,86 ± 95 (2)
VIC.. 28 ans	Début de la maladie en 1961 Radiothérapie en 1963, + .. 1ère hypophysectomie 2ème Intervention en Nov.1965 les 17 Céto. restent élevés après intervention	80 - 95 (2) (après intervention)
GOU.. 38 ans	Hypophysect. le 14.12.65 N'a pas de traitement substitutif. Menstruation 46 j.après hypox	4 - 5,6 - 5,2 (3) (après intervention)
PED.. 50 ans	Acromégalie non traitée, + diabète	14,2 - 16 (2)

(1) Entre parenthèses le nombre de dosage
(2) Ecart type

- Un sujet de 19 ans, ayant subi une intervention pour pinéalome, à l'âge de 11 ans et présentant depuis uns insuffisance hypophysaire cliniquement certaine :

- le taux de STH plasmatique n'est pas détectable - (six dosages effectués avant et après hypoglycémie.)

- 13 enfants de 2 à 13 ans, hospitalisés pour des affections diverses.

- Les prélèvements ont été faits avant et soixante minutes après Insuline ou Tolbutamide pour les épreuves d'hypoglycémie (le jeune âge des enfants ne permettant pas des prélèvements multiples)

- Le sang recueilli sur seringue héparinée est centrifugé à froid - les plasmas sont conservés à - 20°.

Les résultats sont résumés dans le tableau N° 8.

- Chez 12 enfants ayant eu une épreuve d'hypoglycémie nous avons pu constater :

- 7 réponses par une augmentation du taux de S.T.H. plasmatique après stimulation

- 1 sujet ne répondant pas à l'épreuve

- 4 sujets présentant une chute du taux de S.T.H. plasmatique; le taux de départ, avant hypoglycémie était déjà très élevé.

Il convient de signaler que ces épreuves ne sont pas faites au lit du malade et que les enfants, transportés dans un cadre inhabituel, manifestent toujours beaucoup d'appréhension at présentent une grande agitation.

Si l'on excepte les quatre enfants ayant présenté une agitation extrême, lors de l' épreuve, le niveau de S.T.H.plasmatique moyen est de :

$$6{,}35 \pm 8{,}86 \ (\pm \text{ Ecart Type}) \ m\mu g/ml.$$

Ce résultat est donné à titre d'indication; le petit nombre de cas et la diversité des affections étudiées ne permet pas d'interpréter ce chiffre comme le taux normal de S.T.H.

TABLEAU N°8

- TAUX de S.T.H PLASMATIQUE CHEZ 13 ENFANTS -

Nom Age	Diagnostic	Nature de l'épreuve	Flèche (g/l) d'Hypoglycémie	S.T.H. plasmatique mµg/ml Avant	Après
N. 3ans½	Encéphalopatie-Avance staturale	Insuline IV	0,28	1,6	8
G. 7ans½	Malaises hypoglycémiques	Insuline IV	0,35	5 - 3,4 3,1(3-3,2)	15 - 13,6 8,35 (8-8,7)
B. 3ans	Hypothyroïdie	Insuline IV	0,29	16 19	10 3,5 (3,5-3,5)
Br.3ans½	Comitialité	Tolbutamide IV	0,39	1	6
L. 5ans	Retard psychomoteur	Insuline IV	0,21	20 (18-22) 31,5 (35-28)	11 (13-9) 13,7 (18-9,5)
B.11ans	Retard de croissance	Insuline IV	0,28	8,5 (10-7)	18,5 (22-17)
G. 5ans	Nanisme constitutionnel Intra-utérin	Insuline IV	0,25	12,7 (104-15) 35 (34-36)	28,5 (22-35) 40 (48-32)
Go.9ans	Phéochromocytome	Insuline IV	0,12	3,8 (2,2-5,4)	6,1 (5,6-6,6)
K. 6ans	Retard statural	Insuline IV	0,83	10,2 (9,5-11)	4,5 (3-6)
D.10ans	Nanisme Obésité	Insuline IV	0,65	3 (3-3)	2,3 (2-2,6)
A. 3ans	Crise convulsive	Tolbudamide IV Insuline IV	0,38 0,19	2,7 (2,4-3) 2,3 (3-1,6)	6 (8-4) 5,8 (6,5-5,4)
L. 2ans	Hypoglycémie fonctionnelle	Tolbudamide IV	0,40	14,1 (15-13,2)	5 (4,7-5,4)
G. 13ans	Addison	A.C.T.H. 25 U.IV	-	0,5 (1-0)	0 (0-0)

- Des plasmas ont été étudiés 2 ou 3 fois à quelques mois d'intervalle.
- Des résultats donnés par des échantillons à 2 dilutions différentes lors d'une même expérience sont donnés entre parenthèses.

Notons toutefois que HUNTER et GREENWOOD, dans une étude portant sur 142 échantillons de plasma (cycle nycthéméral chez 9 sujets) donnent un chiffre normal chez l'enfant de :

4,28 ± 7,14 (± Ecart Type) mμg/ml.

C O N C L U S I O N S

Le présent travail a porté sur l'étude des différentes méthodes utilisées pour déterminer le taux d'hormone de croissance humaine dans les milieux circulants.

Ces méthodes sont décrites et discutées d'après notre expérience personnelle en ce qui concerne les techniques immunologiques.

I - Nous n'avons pas abordé les méthodes biologiques trop peu sensibles et qui ne sont d'ailleurs utilisées actuellement que pour le dosage d'activité des préparations pharmaceutiques.

II - La technique proposée par READ et BRYAN, basée sur le principe de l'inhibition de l'hémagglutination a une sensibilité supérieure aux précédentes (4 mμg/ml) mais cependant encore insuffisante pour détecter l'activité somatotrope chez le sujet normal lorsque différents procédés ont été employés pour éloigner les facteurs non spécifiques existant dans le sérum ou le plasma humain et interférant avec la somatotrope dans l'inhibition de l'hémagglutination.

Nous avons pu constater que :

- si, avec un peu d'habitude le facteur subjectif intervenant dans la lecture des résultats peut être éliminé,

- la variabilité, dans certaines limites, du titre du sérum anticorps, nécessite pour chaque expérience l'utilisation de 8 dilutions différentes et voisines de ce sérum (technique facilitée par l'emploi de plaques à hémagglutination à la place des classiques tubes de KAHN),

- que cette dernière condition, jointe à quelques modifications de la technique de READ pour la sensibilisation des hématies (l'antigène est fixé sur une protéine du globule rouge par l'intermédiaire du pont chimique de la benzidine), nous a permis d'obtenir des résultats reproductibles avec une sensibilité de 2 mμg/ml, en étudiant des solutions de standard;

- cependant, lorsque nous avons voulu aborder le dosage de l'hormone de croissance plasmatique, nous n'avons pas pu nous débarasser de l'inhibiteur non spécifique, même lorsque nous avons utilisé des extraits de plasma.

III - Nous avons alors abordé les méthodes radioimmunologiques utilisant la compétition qui existe entre l'hormone antigènique et la même hormone marquée à l'iode^{131} dans la formation du complexe "antigène-anticorps".

Cette technique initialement proposée par YALOW et BERSON pour le dosage de l'insuline plasmatique a été appliquée à l'hormone somatotrope avec une sensibilité suffisante pour en permettre la détermination plasmatique chez les sujets normaux.

Une description de la technique a été donnée ainsi qu'une mise au point personnelle de la technique de séparation de la fraction antigène liée aux γ-globulines immunes par électrophorèse en gélose.

Nous avons pu constater que :

1) le marquage de l'hormone somatotrope par l'iode^{131} selon la technique de HUNTER et GREENWOOD donne des résultats reproductibles et satisfaisants, avec en moyenne :

- une activité spécifique de 244,5 µc/µg
- un pourcentage d'Iode^{131} utilisé de 45 %
- un rendement en protéine de 25 %;

2) dans le système de la séparation en gélose, nous avons pu retrouver les constatations des différents auteurs :

- l'existence d'une relation quantitative entre l'antigène marqué à l'Iode^{131} et l'anticorps en présence;
- l'existence d'une relation quantitative entre la dose de somathormone ajoutée et l'quilibre d'un système antigène-anticorps de référence,

3) le seuil de sensibilité de 0,2 m µg est atteint régulièrement, et il a pu être abaissé à 0,05 m µg dans des conditions optima d'expérience.

La précision, la sensibilité, la spécificité et les conditions de réalisation du dosage sont discutées.

IV - Les possibilités d'application de cette technique au dosage de l'hormone somatotrope dans le plasma ont été envisagées et discutées.

Les résultats obtenus par les divers auteurs sont rapportés et nos premiers résultats sont également indiqués.

BIBLIOGRAPHIE

1.- H.BECKS, E.A. KIBRICK, W. MARX and H.M. EVANS
Effects of different dose levels of growth Hormone on tibia of young hypophysectomized female rat
Growth, 1941, 5, 449

2.- H. BECKS, M.E. SIMPSON, H.M. EVANS, R.D. RAY, C.H. LI C.N. ASLING
Response to pituitary growth Hormone and thyroxine of tibias of hypophysectomized rats after long postoperative intervals
Anat. Rec., 1946, 64

3.- S.A. BERSON, R.S. YALOW
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin binding antibody
J. Clin. Invest., 1959, 38, 1996

4.- S.A. BERSON, R.S. YALOW, S.M. GLICK and J. ROTH
Immunoassay of proteines and peptide Hormones
Metabolisme, octobre 1964, 13, n° 10

5.- S.A. BERSON, R.S. YALOW
Immunoassay of proteines hormones
The Hormones, 4, 602 (Pincus Thimann Astwood)

6.- B.J. BOUCHER
Immunoelectrophoresis of human sera with antiserums to Raben's growth Hormone
Nature, 1960, 188, 1025

7.- S. BOYDEN
The adsorption of proteines on erythrocytes treated with tannic acid consequent hemagglutination by antiprotein sera
J. of Experim. Med., 1951, 1, 93

8.- H. BRAUMAN et J. BRAUMAN
Dosage de l'hormone de croissance humaine par la méthode de fixation du complément
Rev. Fr. Et. Clin. et Biol., 1963, 8, 828-832

9.- L.C. CHESLEY
Growth Hormone activity in human pregnancy (1) Sulfatation Factor
Am. J. Obst. Gyn., 1962, 84, 1075

10.- L.C. CHESLEY
Growth hormone activity in human pregnancy. Assay with an in vivo sulfatation method
Am. J. Obst. Gyn., 1963, 87, 8-12

11.- H.C. DAMM
Quantitative observation on the biological and immunological assay of human growth hormone
Endocrinology, 1964, 74, 366-371

12.- W.H. DAUGADAY, W.R. MURPHY, C. HARNETT
Effects of hypophysectomy and growth hormone on incorporation of S^{35} sulfate into epiphysial cartilage
Fed. Proc., 1955, 14, 34

13.- W.H. DAUGADAY, W.D. SALMON and F. ALEXANDER
The measurement of serum sulfatation factor as an index of somatotropin activity in man
J. Clin. Invest., 1958, 37, 6, 888

14.- N.H. DAUGADAY, W.D. SALMON and F. ALEXANDER
Sulfatation factor activity of sera from patients with pituitary disorders
J. Clin. Endoc. and Metabol., 1959, 19, 7, 1414

15.- W.H. DAUGADAY
Human pituitary growth hormone
Ann. Rev. Med., 1965, 16, 47-66

16.- C.W. DENKO and D.M. BERGENSTAL
The effect of hypophysectomy and growth hormone on S^{35} fixation in cartilage
Endocrinology, 1955, 57, 76

17.- J.M. DOMINGUEZ and O.H. PEARSON
Immunologic measurement of growth hormone in human sera
J. Clin. Endoc. Métabol., 1962, 22, 865

18.- D. DZIEWIATKOWSKY
Isolation of chondroitin sulfate S^{35} from articular cartilage of rat
J. Biol. Chem., 1951, 189, 187

19.- R.M. EHRLICH and P.J. RANDLE
Immunoassay of growth hormone in human serum
Lancet, 1961, 230

20.- S. ELLIS, J.HUBLE, M.E. SIMPSON
Influence of hypox and G H in cartilage metabolism
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1953, 84, 603

21.- H.M. EVANS, M.E. SIMPSON and KIBRICK
Bioassay of the pituitary growth hormone. Width of the proximal epiphiseal cartilage of the tibia in hypophysectomized rat
Endocrinology, 1943, 32, 13-16

22.- P. FRANCHIMONT et J. SALMON
Etudes immunochimiques de la somatotrophine et des gonadotrophines hypophysaires humaines
C.R. Soc. Biol., 1962, 156, 179

23.- P. FRANCHIMONT et J. SALMON
Dosage immunologique de la somatotrophine humaine
Ann. Endocrin., 1962, 23, 5, 556

24.- R. FRASER and M. HARTOG
Immunologic studies on human growth hormone.
Ciba foundation colloquia on endocrinology, 1962, 101, 14

25.- J. FREUD, L.H. LEVIE and D.B. KROON
Observations on growth (chondrotrophic) hormone and localisatio of its point of attack
J. Endocr., 1939, 1, 56

26.- C.A. GEMZELL and All.
A method for demonstrating growth hormone activity in human plasma
J. Clin. Endoc. Métab., 1955, 15, 537

27.- C.A. GEMZELL
Demonstration of growth hormone in human plasma
J. Clin. Endocr., 1959, 19, 1049

28.- S.M. GLICK, J. ROTH, R.S. YALOW and S.A. BERSON
Immunoassay of human growth hormone in plasma
Nature, 1963, 199, 784

29.- S.M. GLICK, J. ROTH, R.S. YALOW and S.A. BERSON
Hypoglycemia. Potent stimulus to growth hormone secretion
J. Clin. Invest., 1963, 42, 935

30.- S.M. GLICK, J. ROTH and E.T. LONERGAN
Survival of endogenous human growth hormone in plasma
J. Endocr. Metab., 1964, 24, 501

31.- F.S. GREENSPAN, C.H. LI, M.E. SIMPSON and H.M. EVANS
Bioassay of hypophyseal growth hormone.the tibia-test
Endocr., 1949, 45, 455

32.- F.S. GREENSPAN
Studies on circulating growth hormone
J. Clin. Endocr., 1950, 10-829

33.- F.S. GREENSPAN, J.A. COFELL, W. LEW and C.T. PENG
Assay of human growth hormone with I^{131} labeled antibody
J. Labor. and clin. Med., 1962, 59, n° 3

34.- F.C. GREENWOOD, W.H. HUNTER and J.S. GLOVER
The preparation of ^{131}I labelled human growth hormone of high specific radioactivity
Biochem. J., 1963, 89, 114

35.- F.C. GREENWOOD, W.H. HUNTER, V.J. MARRIAN
Growth-hormone levels in children and adolescents
British Med. J., 1964, 4 january

36.- M.M. GRUMBACH, S.L. KAPLAN and S. SOLOMON
Immunochemical observations on antisera to purified human growt hormone
Nature, 1960, 185,170

37.- M.M. GRUMBACH, S.L. KAPLAN
Immunochemical studies on human growth hormone.a consideration of the human growth hormone anti-human growth hormone system and its application to the assay of growth hormone
Ciba foundation Colloquia on Endocrinology, 1962, 14, 63

38.- D.R. HADDEN
Immunological investigation of H.G.H.
Nature, 1962, 196, 581

39.- B.N. HALPERN, M. JACOB, R. BINAGHI et J. PARLEBAS
Mise en évidence et dosage des anticorps allergiques par l'hémag-glutination in vitro dans les syndromes allergiques humains et expérimentaux
Rev. Fr. d'Allergie, 1961, n° 4

40.- HARTOG M. and R. FRASER
The immunological assay of growth hormone in human serum
J. endocr., 1961, 22, 101

41.- M. HARTOG, M.A. GAAFAR, B. MEISSER and R. FRASER
Immunoassay of serum growth hormone in acromegatic patients
Brit. Med. J., 1964, 2, 1229

42.- M. HARTOG, M.A. GAAFAR, R. FRASER
Effect of corticosteroids on serum growth hormone
Lancet, 1964, 376, 22 August

43.- T. HAYASHIDA and C.H. LI
An immunological investigation of human pituitary growth hormone
Science, 1958, 128, 1276

44.- T. HAYASHIDA, C.H. LI
A comparative immunological study of pituitary growth hormone on various species
Endocrinology, 1959, 65, 6, 944
Path. Biol., 1961, 9, 23-24, 2345

45.- T. HAYASHIDA and B.W. GRUNBAUM
Demonstration of several components in highly purified human growth hormone by immunodiffusion on cellulose acetate
J. Clin. Endocr., 1962, 737

46.- Y. HIRATA and H.T. BLUMENTHAL
Precipitation of Insuline with sera of Insuline treated guinea pigs and rabbits
J. Labor. and Clin. Med., 1962, 60, 194

47.- J. HIRSCHFELD, C.A. GEMZELL and L. WIDE
Immunoelectrophoretic studies on purified human growth hormon
Nature, 1960, 187, 64

48.- W.M. HUNTER and F.C. GREENWOOD
Preparation of Iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity
Nature, 1962, n° 4827

49.- W.M. HUNTER and F.C. GREENWOOD
A radio immunoelectrophoretic assay for human growth hormone
Proc. Biochem. Soc. - Biochem. J., 1962, 85, 39

50.- W.M. HUNTER and F.C. GREENWOOD
Studies on the secretion of human pituitary growth hormone
British Med. J., 1964, 804

51.- W.M. HUNTER and F.C. GREENWOOD
A radio immunoelectrophoretic assay for human growth hormone
Biochem. J., 1964, 91, 43

52.- W.M. HUNTER and W.M. RIGAL
The diurnal pattern of plasma growth hormone concentration in children and adolescents
J. Endocr., 1966, 34, 2, 147-153

53.- W.M. HUNTER, J.A.R. FRIEND and J.A. STRONG
The diurnal pattern of plasma growth hormone concentration in adults
J. Endocr., 1966, 34, 2, 139-146

54.- J.B. JOSIMOVICH and J.A. Mac LAREN
Présence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone
Endocr., 1962, 71, 209

55.- S.L. KAPLAN, M.M. GRUMBACH
Electrophoretic and immunological characteristic of nature and purified growth hormone
Nature, 1962, 196, 336

56.- S.L. KAPLAN, M.M. GRUMBACH
Non specific inhibition in serum and the immunoassay of human growth hormone
J. Clin. Endocr., 1962, 1153

57.- S. KAPLAN
Growth hormone
Am. J. Dis. Child., 1965, 110, 2328

58.- L.W. KINSELL and All.
Studies in growth. Interrelationship between pituitary growth factor and growth promoting androgens in acromegaly and gigantism quantitative evaluation of bone and soft tissue growth in acromegaly and gigantism
J. Clin. Endocr., 1948, 8, 1013

59.- E. KNOBIL and R.O. GREER
The detection of growth hormone in plasma
Hormones in human plasma, 1 vol., 1960, Boston

60.- E. KNOBIL
Growth hormone
Ann. Rev. Physiol., 1964, 26, 47-74

61.- M.D. KOGUT, S.A. KAPLAN and C.S. SHIMIZU
Growth hormone. Use of sulfatation factor as a bioassay for human growth hormone
Pediatrics, 1963, 31, 538

62.- Z. LARON and S. ASSA
Immunochemical studies of human pituitary growth hormone
Act. Endocr., Copenhagen, 1962, 40, 311

63.- C.H. LI and H.M. EVANS
Chemistry of anterior pituitary hormones
The Hormones, 1, 631 (Pincus and Thymann)

64.- C.H. LI and H.M. EVANS
The isolation of pituitary growth hormone
Science, 1944, 99, 183

65.- C.H. LI, H.M. EVANS and M.E. SIMPSON
Isolation and properties of anterior hypophyseal growth hormone
J. Biol. Chem., 1945, 159, 353

66.- C.H. LI and H. PAPKOFF
Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands
Science, 1956, 124, 1293

67.- C.H. LI, N.R. MOUGDAL and H. PAPKOFF
Immunochemical investigations of human pituitary growth hormone
J. Biol. Chem., 1960, 235, 1038

68.- E.E. Mac GARRY, A. BALLANTYNE and J.C. BECK
Effect of human serum on the reaction between hormones and their specific antisera (abstract n° 159)
Endocr. Society - 43rd annual meeting, 1961, 184

69.- E.E. Mac GARRY
Ciba foundation colloquia on endocrinology, 1962, 14, 273

70.- W. MARX, M.E. SIMPSON and H.M. EVANS
Bioassay of the growth hormone of the anterior pituitary
Endocrinology, 1942, 30, 1

71.- W. MARX, M.E. SIMPSON, and H.M. EVANS
Specificity of the epiphysed cartilage test for the pituitary growth hormone
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1944, 55, 250-252

72.- H.G. MORRIS, Y. ARAI, C.J. HLAD, R. TOMPKINS and H. ELRICK
Rapid quantitative immunologic assay for human growth hormone
J. Clin. Endocr., 1964, 24, 417

73.- W.R. MURPHY, W.H. DAUGADAY and C. HARTNETT
The effect of hypophysectomy and G.H. on the incorporation of labeled sulfate into tibial epiphyseal and nasal cartilage of the rat
J. Lat et Clin. Med., 1956, 47, 715

74.- O'CONNOR and SKINNER
Observation on anhemagglutination inhibition technique for estimating H.G.H.
J. Endocr., 1963, 26, 219

75.- M.S. RABEN
Preparation of growth hormone from pituiraries of man and monkey
Science, 1957, 125, 883

76.- M.S. RABEN
Human growth hormone
Recents progress in Horm. Research, 1959, 15, 71-104

77.- C.H. READ and D.B. STONE
An immunological assay for minute amounts of pituitary growth hormone
J. Dis. Child., 1958, 96, 538

78.- C.H. READ and G.T. BRYAN
The immunological assay of H.G.H
Recents progress in Hormone Research, 1960, 16, 187

79.- C.H. READ and G.T. BRYAN
Immunological studies on H.G.H
Ciba foundation colloquia on Endocrinology, 1960, 13

80.- C.H. READ, S.A. EASH and S. NASSAR
Experience with the hemagglutination method of human growth hormone assay
Ciba foundation colloquia on Endocrinology, 1962, 14

81.- REISFELD and All.
Purification of H.G.H on sephadex 200
Nature, 1963, 197, 12006

82.- G. ROSSELIN, G. TCHOBROUTSKY, R. ASSAN and J. DROUET
La méthode radio immunologique d'étude des hormones protéiques de Berson et Yalow
Ann. Endocr. (Paris), 1965, 26, 4

83.- G. ROSSELIN, G. TCHOBROUTSKY, R. ASSAN, J. LELLOUCH et M. DEROT
Etude radio immunologique de la réaction insuline anticorps anti-insuline
Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 1965, 10, 1045-1063

84.- J. ROTH, S.M. GLICK, R.S. YALOW and S.A. BERSON
Hypoglycemia : a potent stimulus to secretion of growth hormone
Science, 1963, 140, 35-70, 987

85.- J. ROTH, S. GLICK, R. YALOW and S. BERSON
Secretion of human growth hormone : physiologic and experimental modification
Metabolisme, 1963, 12, 7, 577

86.- J. ROTH, S.M. GLICK, R.S. YALOW and S. A. BERSON
Antibody to human growth hormone in human subjects treated with H.G.H
J. Clin. Invest., 1964, 43, n°6

87.- W.D. SALMON and W.D. DAUGADAY
Sulfatation factor. A serum component mediating the action of growth hormone in stimulating incorporation of sulfate into cartilage
J. Clin. Invest., 1956, 35, n° 6, 733

88.- W. SALMON, W.H. DAUGADAY
A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro
J. Labor. Clin. Med., 1957, 49, 6, 825

89.- W.D. SALMON, W.H. DAUGADAY
The importance of amino acids as dialysable components of rat serum which promote sulfate uptake by cartilage from hypophysectomised rat in vitro
J. Labor. Clin. Med., 1958, 51, 2, 167

90.- A. SEGALOFF, E.L. KOMRAD and All.
The growth hormone content of human plasma
Endocrinology, 1955, 57, 527

91.- J.S. SKOM and D.W. TALMAGE
Non precipitating insulin antibodies
J. Clin. Invest., 1958, 37, 783

92.- A. STAUB, V. SPRING and H. ELRICK
An improted technique for labelling proteins with I^{131}
Int. J. Appl. Radiat., 1957, 2, 59

93.- A.B. STAVITSKY
Micromethods for the study of proteins and antibody.
J. Immunol., 1954, 72, 360

94.- A.B.STAVITSKY and E.R. ARQUILLA
Procedure and applications of hemagglutination and hemagglutination inhibition reaction with bi - diazotized benzidine and protein conjugated red blood cells
J. Immunol., 1955, 74, 306

95.- G.TCHOBROUTSKY, G. ROSSELIN, R. ASSAN, J.DROUET, M. DEROT
Dosage radio immunologique de l'hormone somatotrope humaine par un système à deux anticorps
Pathol. Biol., 1965, 12, 318

95bis- G.TCHOBROUTSKY, G.ROSSELIN, R.ASSAN, M. DEROT
Données récentes concernant l'hormone somatotrope et son rôle biologique chez l'homme
Presse Méd., 1965, vol 73, p. 2607-2611

96.- J.L. TOUBER and D. MAINGAY
Heterogeneity of human growth hormone its influence on a radio immunoassay of the hormone in serum
Lancet, 1963, 1403

97.- J.L. TOUBER
A radio immunoassay for human growth hormone in serum
Folia Med. Neerl., 1964, 7, 97-101

98.- R.D. UTIGER, M. PARKER and W.H. DAUGADAY
Studies on growth hormone. A radio immunoassay for human growth hormone
J. Clin. Invest., 1962, 41, 2, 101

99.- R.D. UTIGER
Extraction and radio immunoassay of growth hormone in human sera.
J. Clin. Endocr. Métabol., 1964, 24, 1, 60

100.- G.W. WELSH
Immunoassay of human growth hormone (H.G.H) in serum by complement fixation reaction
The endocrine society. Programme of the 46 meating 1964, june 18-19-20

101.- L. WIDE
An immunological method for the assay of human chorionic gonadotrophine
Acta. Endoc., 1962, 41, suppl. 70

102.- R.S. YALOW and S.A. BERSON
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man
J. Clin. Invest., 1960, 39, 1157

103.- R.S. YALOW, S. GLICK, J. ROTH and S.A. BERSON
Radio immunoassay of human ACTH production of ACTH antibodies Extractions of ACTH from plasma
Meeting of Endocrinology - San Francisco, 1964

VU, LE PRESIDENT

P. MOZZICONACCI

VU, LE DOYEN

G. BROUET

VU, ET PERMIS D'IMPRIMER

LE RECTEUR DE L'ACADEMIE

J. ROCHE